

金针菇 *Fvpal1* 基因的 RNAi 降低 PAL 酶活及菌丝色素分泌

陆欢^{1#}, 沈玲^{1,2#}, 刘建雨¹, 尚晓冬^{1*}, 王瑞娟^{1*}, 谭琦¹, 唐桂容¹

1 上海市农业科学院食用菌研究所 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201403
2 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: 本研究构建了金针菇 *Flammulina filiformis* 苯丙氨酸解氨酶基因 1 (*F. filiformis* PAL gene1, *Fvpal1*) 的 RNAi 载体, 以黄色的单核体菌株 0990-⑤ 为受体, 通过遗传转化获得 5 个基因沉默的单核转化子 (RNAi-*Fvpal1* 1-5)。5 个单核转化子再分别与白色的单核体菌株 Dan3 进行杂交, 获得 5 个基因沉默的双核转化子 (ZRNAi-*Fvpal1* 1-5)。考察并分析了单核转化子和双核转化子在 PDA 培养基上的菌丝生长速度、菌丝的 PAL 酶活、菌丝在培养基上的色素分泌及 *Fvpal1* 基因表达量情况, 以验证 *Fvpal1* 基因具有调控金针菇颜色的功能。结果显示, 10 个转化子的 *Fvpal1* 基因表达较野生菌株相比都显著下调 ($P < 0.05$), 其中转化子 RNAi-*Fvpal1* 1-5 分别下调 83.41%、75.92%、79.69%、66.49% 和 43.22%, 转化子 ZRNAi-*Fvpal1* 1-5 分别下调 80.26%、45.24%、34.09%、84.05% 和 79.62%; 除转化子 ZRNAi-*Fvpal1* 4 外的 9 个转化子的 PAL 酶活力都显著低于出发菌株 ($P < 0.05$)。10 个转化子的菌丝在 PDA 培养基上的色素分泌都比出发菌株浅, 双核转化子的菌丝在木屑培养基中的颜色也显著变浅, 以及双核转化子的子实体颜色也比出发菌株浅。本研究构建了金针菇 *Fvpal1* 基因的 RNAi 体系, 发现该基因对金针菇菌丝和子实体的颜色具有正调控作用, 为进一步开展金针菇 *Fvpal1* 基因的功能基因研究提供了数据支撑。

关键词: 金针菇; *Fvpal1* 基因; RNA 干扰; 颜色

[引用本文]

陆欢, 沈玲, 刘建雨, 尚晓冬, 王瑞娟, 谭琦, 唐桂容, 2025. 金针菇 *Fvpal1* 基因的 RNAi 降低 PAL 酶活及菌丝色素分泌. 菌物学报, 44(4): 240258

Lu H, Shen L, Liu JY, Shang XD, Wang RJ, Tan Q, Tang GR, 2025. RNAi of the *Flammulina filiformis* *Fvpal1* gene reduces PAL enzyme activities and mycelial pigment secretion. Mycosystema, 44(4): 240258

资助项目: 上海市农业科学院卓越团队建设计划(沪农科卓[2022]001); 上海市农业科学院助跑计划(ZP24161)
This work was supported by the SAAS Program for Excellent Research Team ([2022]001) and the SAAS Program for Acceleration Plan (ZP24161).
*Corresponding authors. E-mail: SHANG Xiaodong, xdshang@163.com; WANG Ruijuan, wangruijuan@saas.sh.cn
#Co-first author
ORCID: LU Huan (0000-0001-7267-6016), SHANG Xiaodong (0000-0002-9603-6862), WANG Ruijuan (0000-0003-3357-9445)
Received: 2024-09-09; Accepted: 2024-11-18

RNAi of the *Flammulina filiformis* *Fvpal1* gene reduces PAL enzyme activities and mycelial pigment secretion

LU Huan^{1#}, SHEN Ling^{1,2#}, LIU Jianyu¹, SHANG Xiaodong^{1*}, WANG Ruijuan^{1*}, TAN Qi¹, TANG Guirong¹

¹ Key Laboratory of Resources and Utilization of Edible Fungi (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

² College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: RNA interference for the phenylalanine deaminase gene 1 of *Flammulina filiformis* (*F. filiformis* PAL gene1, *Fvpal1*) was constructed, and five gene-silenced mononuclear transformants (RNAi-*Fvpal1* 1–5) were obtained through genetic transformation by using the mononuclear strain 0990-⑤ (yellow) as the receptor. The five transformants were separately crossed with monokaryotic strain Dan3 (white) to obtain five gene-silenced binuclear transformants (ZRNAi-*Fvpal1* 1–5). The *Fvpal1* gene expression and traits of the transformants such as mycelial growth rate in PDA medium, PAL enzyme activity, and mycelial pigment secretion were further investigated to verify that *Fvpal1* gene has the function of regulating the color of *F. filiformis*. The results showed that *Fvpal1* gene expression was significantly down-regulated in all 10 transformants as compared with that in wild strain ($P<0.05$). Mononuclear transformants RNAi-*Fvpal1* 1–5 were down-regulated respectively by 83.41%, 75.92%, 79.69%, 66.49%, and 43.22%, and binuclear transformants ZRNAi-*Fvpal1* 1–5 were down-regulated respectively by 80.26%, 45.24%, 34.09%, 84.05%, and 79.62%. All nine transformants except the binuclear transformant ZRNAi-*Fvpal1* 4 had significantly lower PAL-ase activity than the original strain 0990-⑤ ($P<0.05$). The mycelial pigment secretion of all the 10 transformants grown on PDA medium was lighter than that of the original strain, and the colour of the binucleate transformants became lighter even more significantly on woodchip medium. The fruiting body color of the binuclear transformants is also lighter than that of the strain 0990-⑤. In this study, the RNAi system of *Fvpal1* gene of *F. filiformis* was constructed, and it was found that this gene had a positive regulatory effect on the color of mycelium and fruiting body of *F. filiformis*. The results provide preliminary evidence in support of further functional gene research of *Fvpal1* of *F. filiformis*.

Keywords: *Flammulina filiformis*; *Fvpal1* gene; RNA interference; colour

金针菇 *Flammulina filiformis* (Z.W. Ge, X.B. Liu & Zhu L. Yang) P.M. Wang *et al.*, 又称构菌、冬菇、毛柄金钱菌, 隶属蘑菇纲 Agaricomycetes、蘑菇目 Agaricales、膨瑚菌科 Physalacriaceae、冬菇属 *Flammulina* (戴玉成和杨祝良 2018; 戴玉成等 2021)。金针菇肉质脆嫩、味道鲜美, 不仅具有较高的营养价值, 还具有促进智力发育、

抗氧化和抗癌等药用价值, 尤其深受亚洲地区的消费者喜爱(Ukaegbu *et al.* 2018; 陆欢等 2021; 王桂林等 2021; 王慧等 2021; Luo *et al.* 2022)。根据金针菇子实体的颜色可将其分为白色和黄色两类, 野生金针菇子实体都是黄色, 白色金针菇是在选育过程中产生的突变体。世界上第一株白色金针菇‘信浓2号’是日本 Takemaru 通过单孢分

离,再经反复侧交和杂交而得(Sharma *et al.* 2021);我国第一个金针菇主栽品种‘三明 1 号’(子实体为黄色)是通过野生金针菇驯化而得。目前,我国金针菇主栽品种是从日本引进的白色金针菇品种(刘询等 2023)。

有学者通过侧交和杂交等方法对金针菇子实体的颜色遗传变化进行了研究,其中黄色为显性,白色为隐性,白色菌株在杂交育种过程中还会影响杂交后代菌株的颜色。但对金针菇子实体的颜色是由一对等位基因控制还是由多对等位基因控制仍众说纷纭。因此,还需研究人员建立更有效的方法对金针菇子实体的颜色遗传进行深入研究(Kong *et al.* 2004; 谢宝贵等 2004; 蚁瑞荣等 2007a, 2007b; 刘丽娜 2016)。刘丽娜(2016)提取了黄色金针菇中的色素,鉴定其为 3,4-二羟苯基丙氨酸(DOPA)类黑色素;比较了黄色和白色金针菇的色素合成关键酶活性,发现黄色金针菇的超氧化物歧化酶(SOD)活性明显低于白色,但酪氨酸酶的活性显著高于白色;进一步通过转录组测序和实时荧光定量 PCR 发现酪氨酸酶基因 CL1942 contig2、CL1942 contig3、CL1942 contig4 在黄色金针菇中的表达量高于白色金针菇,说明金针菇中的黑色素合成与酪氨酸酶基因的表达密切相关。

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC4.3.1.24)常见于植物和真菌中,主要作用是催化 L-苯丙氨酸脱氨基生成反式肉桂酸。PAL 也是苯丙烷代谢途径的关键引发剂,苯丙烷代谢是植物体内重要的次生代谢途径,可产生各种苯丙素,如类黄酮、异黄酮、香豆素、花青素、木质素和其他酚类化合物(Kong 2015)。此外,有研究发现 PAL 不仅与植物的果皮颜色有关,还在植物抗逆、抗病中也起着重要作用(李海芬等 2017; Fan *et al.* 2022; 胡梦蝶等 2022; Zhao *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2023; Augustine *et al.* 2024)。有关食用菌中 PAL 的相关研究报道

极少,仅在少数食用菌品种中成功克隆并鉴定出 PAL 基因,对其功能的研究也甚少(Yun *et al.* 2015; Lin *et al.* 2018; Hou *et al.* 2019; 王艳 2020; Im *et al.* 2023)。目前有研究发现糙皮侧耳和灰树花中的 PAL 基因具有调节环境胁迫响应的作用(Hou *et al.* 2019; 王艳 2020)。Yun *et al.* (2015)在金针菇中克隆了 PAL 基因并对其表达特征进行了分析,发现 PAL 基因在菌丝和不同发育阶段的子实体中均有表达,且在菌柄生长中也发挥了一定的功能。Im *et al.* (2023)发现与黄色金针菇相比,白色金针菇的 *Fvpal1* 基因都缺少了 Δ GCGCAC 这 6 个碱基,导致第 112 和 113 位的 2 个氨基酸(精氨酸和苏氨酸)缺失;且 *Fvpal1* 基因中带有和不带有 AGCGCAC 缺失的单孢子交配产生的后代显示出非白色子实体,然而带有变异 *Fvpal1* 基因的单孢子交配产生的后代只有白色子实体,表明 *Fvpal1* 基因在决定金针菇子实体的颜色方面起着重要作用。Fu *et al.* (2022)分析了黄色金针菇采后贮藏过程中的生化和代谢变化,推测金针菇中黑色素可能是通过苯丙氨酸-酪氨酸-L-多巴-5,6-二羟基吲哚(5,6-dihydroxyindole, DHI)/5,6-二羟基吲哚-2-羧酸(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, DHICA)-黑色素途径合成的,还发现酪氨酸代谢途径和苯丙素类生物合成途径的上调。综上所述,推测 *Fvpal1* 基因可能影响 PAL 在金针菇生长过程中的作用,进而影响了金针菇子实体中黄酮类、多酚类和黑色素等可调控颜色的物质生成。

随着高通量测序技术的高速发展,为挖掘白色与黄色金针菇中具有变异的基因位点或具有差异表达的基因提供了快速可靠的手段,再结合 RNA 干扰、基因过表达或者基因敲除等基因编辑技术对差异基因的功能进行验证。近年来,利用 RNA 干扰技术开展金针菇的基因功能研究已经取得了一定的进展(Lyu *et al.* 2021; Yan *et al.*

2022)。目前, *Fvpal1* 基因中 6 个碱基的缺失与是否是鉴定金针菇子实体颜色的关键, 但该基因的功能及与该基因密不可分的 PAL 酶活是否与金针菇颜色相关都缺乏更系统、深入的研究。本研究拟通过构建金针菇 *Fvpal1* 基因的 RNAi 体系, 以黄色的单核体菌株为出发菌株, 通过将 RNA-*Fvpal1* 转入出发菌株, 再将 RNAi 转化子与白色的单核体菌株进行杂交, 测定单核转化子和双核转化子菌丝的 PAL 酶活、菌丝培养阶段的颜色、*Fvpal1* 基因表达量情况, 以及双核转化子的子实体颜色, 来探究金针菇 *Fvpal1* 的基因功能, 为揭示 *Fvpal1* 基因与金针菇菌丝阶段的颜色相关性, 以及为后续研究金针菇子实体颜色的遗传机制提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和质粒

试验菌株为金针菇黄色的单核体菌株 0990-⑤和白色的单核体菌株 Dan3, 均由上海市农业科学院食用菌研究所提供; 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和农杆菌 EHA105 购于上海唯地生物技术有限公司; 载体 DPV 由本实验室保藏、提供。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Spe* I、*Mlu* I、I5 高保真酶(赛默飞世尔科技公司); Ex Taq Mix、RNA 提取、产物纯化试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒、质粒小提试剂盒(上海艾科瑞生物科技有限公司); T4 连接酶试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]; ABScript Neo RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover 试剂盒(武汉爱博泰克生物科技股份有限公司); 苯丙氨酸解氨酶试剂盒[齐一生物科技(上海)有限公司]。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基; LB 固体培养基; 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基; 马铃薯葡萄糖(PDB)培

养基; 诱导培养基(induction media, IM): 1 mL K-Buffer, 2 mL M-N solution, 0.1 mL CaCl₂ (1%), 1 mL FeSO₄ (0.01%), 0.25 mL NH₄NO₃ (20%), 0.5 mL Spore elements, 1 mL 丙三醇(50%), 4 mL MES, 0.5 mL 葡萄糖(2 mol/L), 无菌 ddH₂O 定容至 100 mL。使用时加入 100 mmol/L 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS) 0.2 mL, 用 NaOH 或 HCl 调节 pH 为 5.6; 共培养基(Co-IM): 诱导培养基添加 20 g/L 琼脂粉, 用 NaOH 或 HCl 调节 pH 为 5.6; 木屑培养基(100 g): 玉米芯 40 g、木屑 30 g、麸皮 26 g、玉米粉 3 g、石膏 1 g, 总含水量 65%, pH 6.5。工厂化栽培培养基: 培养基干物质构成包括玉米芯 38.5%, 米糠 29.5%, 麸皮 9.6%, 棉籽壳 5.4%, 大豆皮 3.2%, 啤酒糟 4.8%, 甜菜渣 3.2%, 豆渣 3.5%, 贝化石 1.6%, 轻质碳酸钙 0.7%, 含水量约 65%, pH 自然。

1.2 目标序列的克隆和 *Fvpal1* 基因 RNAi 表达载体构建

选取 *Fvpal1* 基因的一段保守结构域, 设计两端带酶切位点的特异引物, 以菌株 0990-⑤和 Dan3 的 cDNA 为模板扩增目标序列(388 bp), 将具有双向启动的 RNAi 载体 DPV 用 *Spe* I、*Mlu* I 进行双酶切, 再通过 T4 连接酶将正确的目标序列连接到 DPV 酶切的线性化片段上, 最后生成含有潮霉素 B 磷酸转移酶基因(*Hyg*)修饰的 RNA 干扰质粒 RNAi-*Fvpal1*。将载体 RNAi-*Fvpal1* 转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 挑取单克隆, 提取质粒。分别以 F1-F/F1-R 为引物进行菌液 PCR 验证, 以 *Spe* I、*Mlu* I 进行双酶切验证, PCR 产物回收后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。载体构建所需引物见表 1。

1.3 *Fvpal1* 基因 RNAi 载体工程菌制备

采用冻融法将 RNAi-*Fvpal1* 质粒导入农杆菌 EHA105 感受态细胞, 并通过菌液 PCR 检测工程菌株是否携带载体 *Lgpd* 和目的基因片段。反应体系(20 μ L): 菌液 1 μ L, 正向引物 F1-F

表 1 本研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
Fve-F	GG <u>ACTAGT</u> GGAAATGGACCTGCTACACTC
Fve-R	CG <u>ACGCGT</u> TGACCAATAGTAGGGTCATCG
Hyg-F	GATGTTGGCGACCTCGTATT
Hyg-R	TCGTTATGTTTATCGGCACTTT
Fl-F	GCAGGTCCGAGGTACTAAAG
Fl-R	ATCTCCGGAGGCTGAGATG
Qgpd-F	CTCGCTTTCCGTGTCCCTA
Qgpd-R	CATGGCAGCCTTGATCTCC
Qfv-F	CAAGGCACTAGTGTCTACGGC
Qfv-R	CAAGCCTCAGGCATGCTTG

注：下划线中的引物序列为酶切位点
Note: Primer sequences underlined are enzyme cleavage sites.

(10 mmol/L)和反向引物 Fl-R (10 mmol/L)各 1 μL, Ex Taq Mix 10 μL, ddH₂O 7 μL。反应程序: 95 °C预变性 5 min; 95 °C变性 30 s, 62 °C退火 30 s, 72 °C延伸 40 s, 33 个循环; 72 °C延伸 10 min。

1.4 金针菇菌丝潮霉素致死浓度筛选实验

取菌株 0990-⑤直径约为 5 mm 的菌块分别接种于含不同潮霉素(Hyg)浓度的 PDA 固体培养基中, Hyg 浓度共设置 0、2、4、6、8、10 mg/L 6 个梯度, 每个梯度分别设 3 个重复, 20 °C恒温静置培养 15 d, 观察菌丝生长形态, 确定致死浓度。

1.5 金针菇遗传转化及转化子筛选鉴定

1.5.1 制备金针菇菌丝碎片

- (1) 将在 PDA 培养基上培养 7–10 d 的金针菇菌丝(带培养基一起, D=90 mm)挑入均质仪中, 加入 100 mL PDB 培养基, 间歇打碎 30 s。
- (2) 取步骤(1)中含有菌丝的液体 30 mL 接入新的 PDB 培养基中, 20 °C静置避光培养 4 d, 培养期间早中晚手动摇菌, 正反方向各 10 s。将培养好的菌丝再次用均质仪间歇打碎, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入诱导培养基(不含 AS)至沉淀物中, 悬浮待用(含 1×10⁷ 个/mL 菌丝碎片)。

1.5.2 农杆菌的活化培养

- (1) 在含有 20 mg/L 利福平(rifampicin, Rif)和 50 mg/L 卡那霉素(kanamycin, Kan)的 LB 固体培养基平板上划线接种带有目的载体的农杆菌, 于 28 °C培养箱中倒置培养 1–2 d。
- (2) 挑取单菌落接种于 1mL LB 液体培养基(含 20 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan), 28 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀=0.5–0.6。
- (3) 取步骤(2)培养好的 50 μL 农杆菌菌液, 接种于 5 mL PDB 培养基(含 50 mg/L Kan), 28 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀=0.5–0.6。
- (4) 取步骤(3)中培养好的菌液 1 mL, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀重悬于 5 mL 诱导培养基(添加 AS 200 μmol/L), 28 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀=0.5–0.6。活化的农杆菌要立即用于转化。

1.5.3 农杆菌介导的菌丝碎片转化

- (1) 将打碎的金针菇菌丝与农杆菌菌液等体积混匀, 超声 2 min (35 kHz, 160 W), 20 °C静置 30 min 后涂布于表面铺有微孔滤膜的共培养基表面(添加 AS 200 μmol/L, Hyg 5 mg/L, 头孢噻肟钠 Cef 400 mg/L), 设 10 个重复。
- (2) 20 °C避光培养, 共培养基(含 Hyg 5 mg/L, Cef 600 mg/L, AS 200 μmol/L)表面萌发出菌丝

后,向共培养基平板内倒入 PDA 筛选培养基(含 Hyg 7 mg/L, Cef 600 mg/L)直至完全覆盖共培养基内萌发的菌丝,20 °C避光培养 10 d,统计萌发、生长的转化子数。挑取转化子单菌落接种于中间放置没有被农杆菌侵染的菌丝(对照)的 PDA 培养基(含 Hyg 7 mg/L, Cef 600 mg/L)上进行培养,置于 20 °C培养箱中培养,观察菌丝的萌发和生长情况;挑取萌发出菌丝的菌块再次接入复筛培养基上进行培养,最后挑取菌丝接种于不含抗生素的 PDA 培养基上,继代培养 5 代。

1.5.4 拟转化子的验证及筛选

通过菌落 PCR 对拟转化子进行验证,挑取 0.1–1.0 µg 菌丝于 50 µL TE buffer 中,于 PCR 仪中 97 °C热解 7 min,获得拟转化子的粗 DNA。取 2 µL DNA 为模板,以 Fl-F/Fl-R 和 Hyg-F/Hyg-R 为引物进行 PCR 扩增,将 PCR 产物回收后进行测序[生工生物工程(上海)股份公司],依据测序结果确定是否为转化子。

1.6 转化子和单核体菌株 Dan3 杂交及 PCR 验证

将上述确定为转化子的菌株与单核体菌株 Dan3 进行杂交,杂交菌株通过显微镜进行镜检,若具有锁状联合则杂交成功,无锁状联合则杂交失败。将杂交成功的菌株利用 Fl-F/Fl-R 和 Hyg-F/Hyg-R 引物再次进行菌落 PCR 验证,将 PCR 产物回收后进行测序[生工生物工程(上海)股份公司],依据测序结果确定是否为转化子。

1.7 荧光定量 PCR 检测 *Fvpal1* 基因表达情况

以金针菇 *gpd* 基因为内参基因,单核转化子以出发菌株 0990-⑤的 cDNA 为对照,双核转化子以出发菌株 0990-⑤和 Dan3 的杂交菌株的 cDNA 为对照。利用 RNA 提取试剂盒(Vazyme)提取 RNAi-*Fvpal1* 和 ZRNAi-*Fvpal1* 的 RNA。使用 ABclonal 的 ABScript Neo RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover 试剂盒进行两步法 RT-qPCR 检测。第一步进行逆转录反应合成

cDNA,第二步进行 qPCR 反应,反应体系(20 µL): 2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 10 µL, 正反向引物(10 µmol/L)各 0.4 µL, 模板 cDNA 0.5 µL, Nuclease-free H₂O 8.7 µL。反应程序: 95 °C预变性 3 min; 94 °C变性 5 s, 60 °C退火 30 s, 40 循环。每个样品设 3 个复孔,相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。用于 qRT-PCR 的引物序列见表 1。

1.8 单核转化子及双核转化子菌丝的生长速度及菌丝形态的观察

取活化后直径为 5 mm 的单核和双核转化子菌株分别接种至 PDA 培养基上进行培养,设 4 个重复。采用十字交叉法测量培养 11 d 的菌丝平均生长速度,用 Origin 软件进行显著性分析。

1.9 PAL 酶活测定

刮取 1.8 中培养 13 d 的菌丝,利用苯丙氨酸解氨酶试剂盒[齐一生物科技(上海)有限公司]测定菌丝的 PAL 酶活,用 Origin 软件进行显著性分析。

1.10 双核转化子在木屑培养基中的生长情况

按木屑培养基配方配制培养料,每袋装 550 g 湿料,121 °C高温灭菌 4 h,冷却至室温后待用。将 1 个平板上的菌丝划分为 1 cm × 1 cm 左右的菌块,全部接入到 1 个栽培袋的培养基表面,接种后置于 20 °C培养箱中静置培养,待菌丝长满栽培袋后,观察菌丝体的颜色。

1.11 双核转化子的子实体生长情况

在山东德州基地按工厂化栽培条件对双核转化子进行培养和栽培,待菌丝长满栽培瓶移入出菇房后,观察子实体的颜色。

2 结果与分析

2.1 金针菇 *Fvpal1* 基因 RNAi 目标序列获得

以菌株 0990-⑤总 RNA 和菌株 Dan3 总 RNA 为模板,通过 Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂

盒进行 cDNA 合成,利用带酶切位点的特异引物 Fve-F/Fve-R 对获得的 cDNA 进行扩增,电泳图谱条带清晰,以菌株 0990-⑤和菌株 Dan3 的 cDNA 为模板的扩增产物均在 388 bp 处出现明显条带,且扩增产物大小与预期一致(图 1)。将扩增产物的测序结果与 NCBI 上的目标序列进行比对(图 2),菌株 0990-⑤的 cDNA 扩增序列从起始密码子开始的第 345 位碱基由 A 突变为 G,但所编码的氨基酸仍是谷氨酰胺,属同义突变,不影响后续实验。但菌株 Dan3 的 cDNA 扩增序列比原序列缺少 6 个碱基(ΔGCGCAC),这与 Im *et al.* (2023)的研究结果一致。将序列比对正确的产物纯化后用于下一步试验。

2.2 RNAi 重组表达载体 PCR 鉴定及测序验证

将 *Spe* I 和 *Mlu* I 双酶切位点引入 RNAi 目标序列中,与双酶切后的 DPV 线性化载体连接构成重组表达载体 RNAi-*Fvpal1* (图 3A)。大肠杆菌菌液 PCR 检测见图 3B,引物 FIHh-F/FI-R 扩增条带大小为 520 bp (由 153 bp 的 *Lgpd* 和 327 bp 的 RNAi 目标序列组成),符合重组后序列预期长度。

选用 *Spe* I 和 *Mlu* I 两处酶切位点对 RNAi-*Fvpal1* 进行单酶切和双酶切鉴定,载体上的 RNAi 目标序列片段可被完整切除,单酶切后得

到长度约 12 000 bp 的线性化载体的单一条带;双酶切后于 388 bp 和 10 000 bp 处都得到了一条清晰的条带(图 3C),其中 388 bp 处条带长度与 RNAi 目标序列基本一致,10 000 bp 处则可以定为反应后具有双黏性末端的 RNAi-*Fvpal1* 载体,说明酶切后成功构建了含有 Hyg 修饰的 RNAi-*Fvpal1* 质粒。随机挑选 6 个 RNAi-*Fvpal1* 农杆菌工程菌株单菌落进行 PCR 扩增,通过引物 FI-F/FI-R 扩增出 520 bp 的片段,说明载体已经成功转化农杆菌菌株(图 4)。

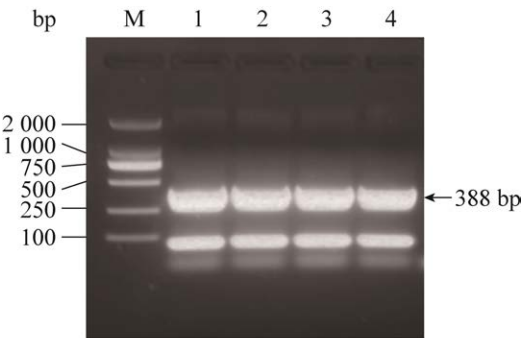


图 1 金针菇 RNAi 目标序列 PCR 产物 1, 2: 单核菌株 0990-⑤扩增 RNAi 目标序列; 3, 4: 单核菌株 Dan3 扩增 RNAi 目标序列

Fig. 1 RNAi target sequence PCR product of *Flammulina filiformis*. M: DL 2 000 DNA marker; 1, 2: The amplified RNAi target sequence of strain 0990-⑤; 3, 4: The amplified RNAi target sequence of strain Dan3.

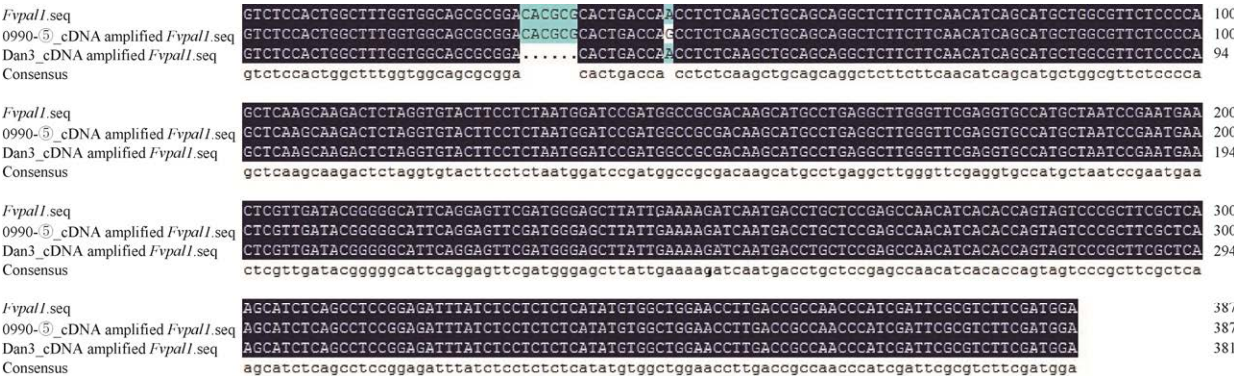


图 2 RNAi 目标序列测序结果比对
Fig. 2 Comparison of sequencing results of RNAi target sequence.

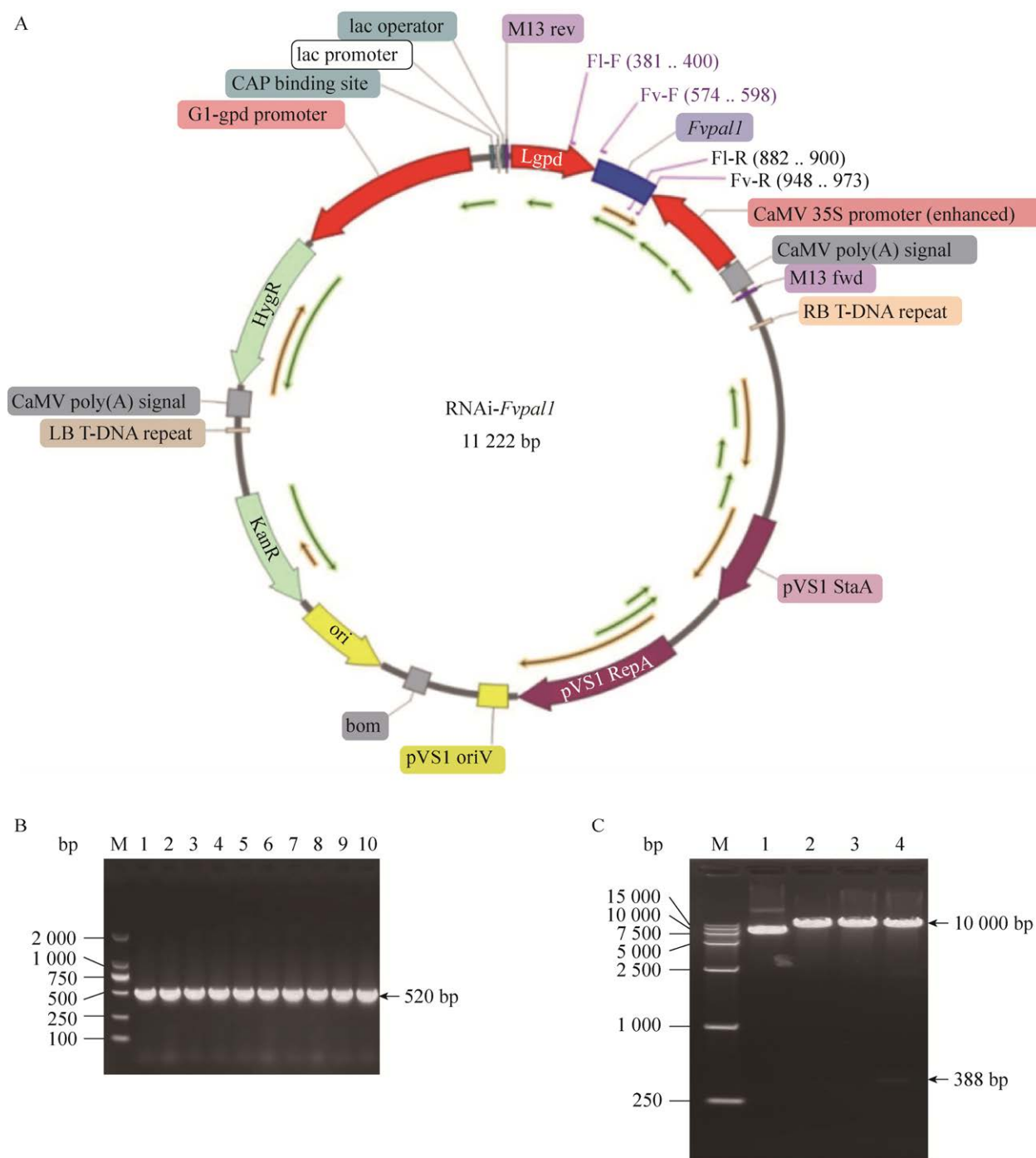


图 3 RNAi 载体 RNAi-Fvpal1 的构建及鉴定 A: RNAi-Fvpal1 表达载体结构图. B: 大肠杆菌菌液 PCR 凝胶电泳结果. C: RNAi-Fvpal1 酶切凝胶电泳结果; M: DL 15 000 DNA marker; 1: RNAi-Fvpal1 质粒; 2: *Spe* I 单酶切 RNAi-Fvpal1 条带; 3: *Mlu* I 单酶切 RNAi-Fvpal1 条带; 4: *Spe* I 和 *Mlu* I 双酶切 RNAi-Fvpal1 条带

Fig. 3 Construction and verification of the RNA interference RNAi-Fvpal1. A: RNAi-Fvpal1 plasmid structure map; B: PCR gel electrophoresis of *Escherichia coli* liquid; C: Gel electrophoresis of RNAi-Fvpal1 double enzyme digestion, M: DL 15 000 DNA marker, 1: RNAi-Fvpal1 plasmid, 2: *Spe* I mono-digested RNAi-Fvpal1 bands, 3 : *Mlu* I mono-digested RNAi-Fvpal1 bands, 4: *Spe* I and *Mlu* I double-digested RNAi-Fvpal1 bands.

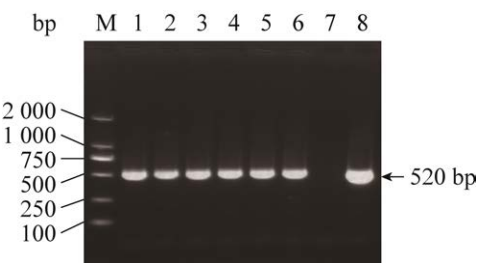


图 4 农杆菌工程菌菌液 PCR 凝胶电泳图
M: DL 2 000 DNA marker; 1–6: RNAi-*Fvpal1* 转化农杆菌工程菌株; 7: ddH₂O; 8: RNAi-*Fvpal1* 质粒

Fig. 4 PCR gel electrophoresis of *Agrobacterium* engineering bacteria. M: DL 2 000 DNA marker; 1–6: *Agrobacterium* strains transformed with RNAi-*Fvpal1*; 7: ddH₂O; 8: RNAi-*Fvpal1* plasmid.

2.3 金针菇菌丝潮霉素致死浓度筛选结果

金针菇的菌丝对潮霉素非常敏感,在不含有潮霉素的 PDA 培养基上,金针菇菌丝正常生长,在含有潮霉素的 PDA 培养基上,金针菇菌丝不萌发或生长极其缓慢。当培养基中潮霉素浓度为 4 mg/L 时,金针菇菌丝的生长速度较同时期在正常培养基中培养的菌丝相比生长速度缓慢,菌丝生长明显受到抑制。当潮霉素浓度大于 6 mg/L 时,金针菇菌丝无萌发延伸能力(图 5)。

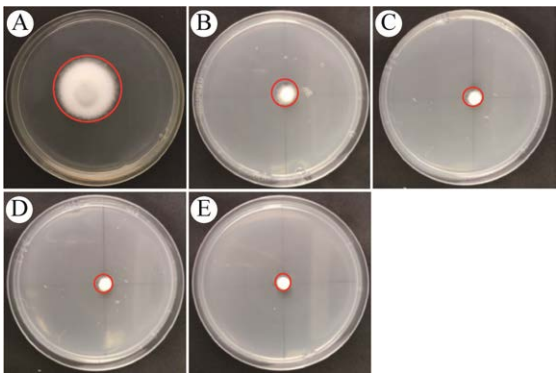


图 5 在添加不同浓度潮霉素的 PDA 培养基上的菌丝生长情况 A、B、C、D、E 中潮霉素质量浓度分别为 0、2、4、6、8 mg/L

Fig. 5 Mycelial growth of *Flammulina filiformis* on PDA medium with different concentration of hygromycin. The mass concentration of hygromycin from A to E is 0, 2, 4, 6, 8 mg/L, respectively.

根据筛选结果,本研究选择在 PDA 培养基上添加浓度为 5 mg/L 的潮霉素用于初步筛选转化子的抗性,在 PDA 培养基上添加浓度为 7 mg/L 的潮霉素用于转化子的复筛。

2.4 转化子筛选及 PCR 验证

在共培养基上再覆盖一层 PDA 培养基作为筛选培养基,菌丝萌发情况见图 6A。分别将萌发的菌丝接种到复筛培养基上进行培养,得到 10 个 RNAi-*Fvpal1* 拟转予(图 6B)。10 个拟转化子在 PDA 培养基上进行传代培养,对传代至第 5 次的菌丝进行 PCR 扩增,扩增结果见图 7。根据 PCR 产物测序结果最终获得 5 个单核转化子,依次命名为 RNAi-*Fvpal1* 1、RNAi-*Fvpal1* 2、RNAi-*Fvpal1* 3、RNAi-*Fvpal1* 4、RNAi-*Fvpal1* 5。

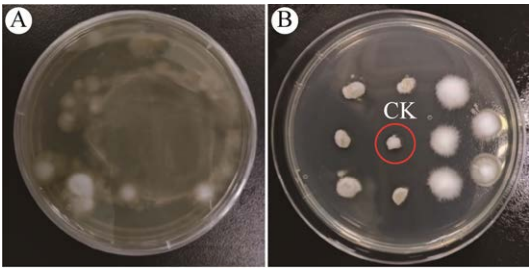


图 6 初筛和复筛拟转化子菌丝生长情况

Fig. 6 Mycelial growth of RNAi transformants in primary and secondary screening.

2.5 转化子和白色的单核体菌株杂交及 PCR 验证结果

分别将单核菌株 0990-⑤、RNAi-*Fvpal1* 1–5 与单核菌株 Dan3 进行杂交,6 个杂交菌株镜检后发现均有锁状联合(图 8),说明所有菌株全部杂交成功,将 RNAi-*Fvpal1* 1–5 与单核菌株 Dan3 的杂交菌株分别命名为 ZRNAi-*Fvpal1* 1、ZRNAi-*Fvpal1* 2、ZRNAi-*Fvpal1* 3、ZRNAi-*Fvpal1* 4、ZRNAi-*Fvpal1* 5。对 6 个杂交菌株进行菌落 PCR 扩增,扩增产物电泳结果见图 9。

2.6 *Fvpal1* 基因表达情况

收集培养 13 d 的杂交菌株的菌丝,利用试剂盒提取 RNA 后反转录成 cDNA。qPCR 结果

显示,与出发菌株 0990-⑤相比,单核转化子 RNAi-*Fvpal1* 1-5 中的 *Fvpal1* 基因表达量分别下调了 83.41%、75.92%、79.69%、66.49%和 43.22% (图 10A)。与杂交菌株 0990-⑤×Dan3 相比,在双核转化子 ZRNAi-*Fvpal1* 1-5 中的 *Fvpal1* 基因表达量分别下调了 80.26%、45.24%、34.09%、84.05%和 79.62% (图 10B)。

2.7 菌落形态观察及菌丝生长速度测定结果

与出发菌株 0990-⑤相比,单核转化子 RNAi-*Fvpal1* 1-5 在 PDA 培养基上的菌丝表现为气生

菌丝更浓密,边缘更整齐、长势更快(图 11A),其中转化子 RNAi-*Fvpal1* 1、RNAi-*Fvpal1* 2 和 RNAi-*Fvpal1* 3 的菌丝生长速度显著偏快, RNAi-*Fvpal1* 4 的菌丝生长速度显著偏慢(图 12A)。菌株 0990-⑤的菌丝边缘可分泌出深褐色物质,5 个单核 RNAi 转化子菌丝边缘分泌出的物质颜色较出发菌株 0990-⑤的浅(图 11B)。可能与 *Fvpal1* 基因对金针菇菌丝的生长具有负调控作用,而对菌丝周边褐色物质形成具有正调控作用相关。

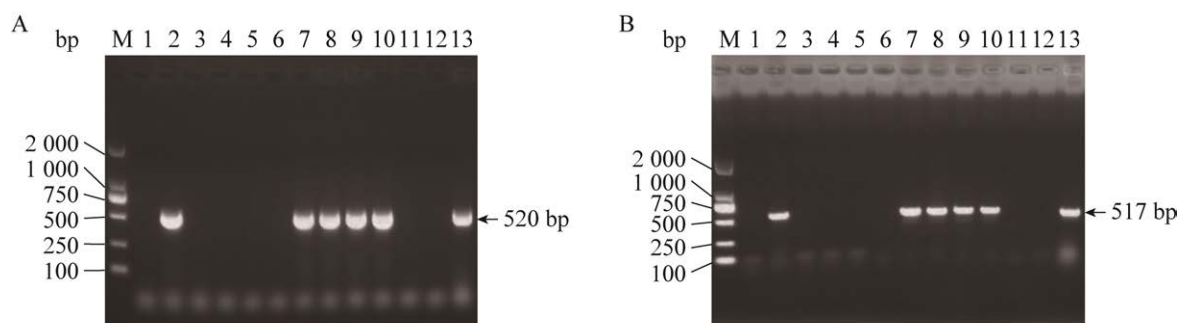


图 7 拟转化子特异引物 PCR A: 潮霉素基因 PCR 鉴定结果; M: DL 2000 DNA marker; 1-10: 拟转化子; 11: 原始菌株 0990-⑤; 12: ddH₂O; 13: RNAi-*Fvpal1* 质粒; B: RNAi-*Fvpal1* 的特异序列 PCR 鉴定结果; M: DL 2000 DNA marker; 1-10: 拟转化子; 11: 原始菌株 0990-⑤; 12: ddH₂O; 13: RNAi-*Fvpal1* 质粒

Fig. 7 PCR for specific primers of RNAi transformants. A: Identification results of RNAi-*Fvpal1*, M: DL 2 000 DNA marker, 1-10: RNAi-*Fvpal1* transformants, 11: The original strain 0990-⑤, 12: ddH₂O, 13: RNAi-*Fvpal1* plasmid; B: PCR identification results of hydromycin gene, M: DL 2 000 DNA marker, 1-10: RNAi-*Fvpal1* transformants, 11: The original strain 0990-⑤, 12: ddH₂O, 13: RNAi-*Fvpal1* plasmid.

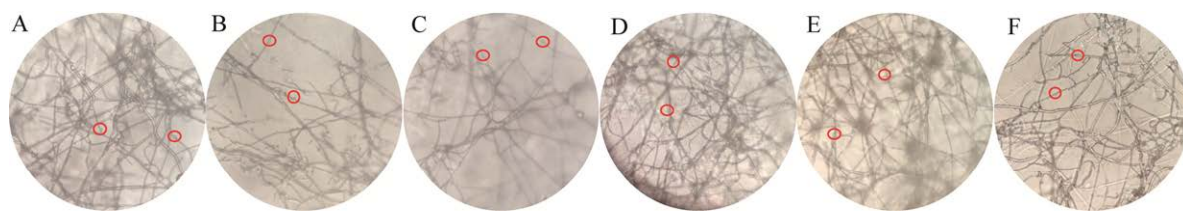


图 8 菌株 0990-⑤及 RNAi-*Fvpal1* 1-5 与菌株 Dan3 杂交菌株锁状联合图 A: 0990-⑤和 Dan3 杂交菌株的锁状联合; B: RNAi-*Fvpal1* 1 和 Dan3 杂交菌株的锁状联合; C: RNAi-*Fvpal1* 2 和 Dan3 杂交菌株的锁状联合; D: RNAi-*Fvpal1* 3 和 Dan3 杂交菌株的锁状联合; E: RNAi-*Fvpal1* 4 和 Dan3 杂交菌株的锁状联合; F: RNAi-*Fvpal1* 5 和 Dan3 杂交菌株的锁状联合

Fig. 8 Clamp connection of mycelia (indicated with circles) of 0990-⑤ and RNAi-*Fvpal1* 1-5 hybridized with Dan3. A: 0990-⑤ hybridized with Dan3; B: RNAi-*Fvpal1* 1 hybridized with Dan3; C: RNAi-*Fvpal1* 2 hybridized with Dan3; D: RNAi-*Fvpal1* 3 hybridized with Dan3; E: RNAi-*Fvpal1* 4 hybridized with Dan3; F: RNAi-*Fvpal1* 5 hybridized with Dan3.

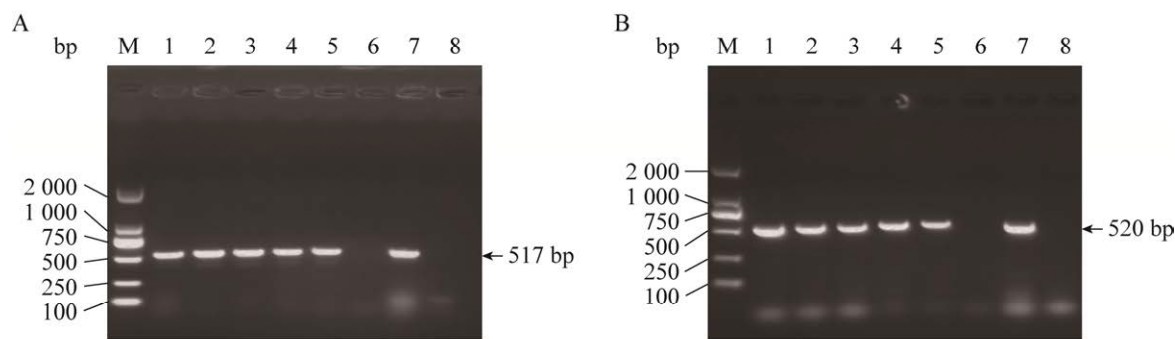


图 9 杂交菌株特异引物 PCR A: 杂交菌株 RNAi-*Fvpal1* 特异序列的 PCR 鉴定结果, M: DL 2 000 DNA marker; 1-5: ZRNAi-*Fvpal1* 拟转化子; 6: 0990-⑤×Dan3 杂交菌株; 7: RNAi-*Fvpal1* 质粒; 8: ddH₂O; B: 杂交菌株潮霉素基因的 PCR 鉴定结果, M: DL 2 000 DNA marker; 1-5: ZRNAi-*Fvpal1* 拟转化子; 6: 0990-⑤×Dan3 原始菌株; 7: RNAi-*Fvpal1* 质粒; 8: ddH₂O

Fig. 9 Hybrid strain specific primer PCR. A: PCR identification results of the specific sequences of the hybrid strain RNAi-*Fvpal1*, M: DL 2000 DNA marker, 1-5: ZRNAi-*Fvpal1* transformants, 6: The original strain 0990-⑤×Dan3, 7: RNAi-*Fvpal1* plasmid, 8: ddH₂O. B: PCR identification results of hygromycin gene, M: DL 2000 DNA marker, 1-5: ZRNAi-*Fvpal1* transformants, 6: The original strain 0990-⑤×Dan3, 7: RNAi-*Fvpal1* plasmid, 8: ddH₂O.

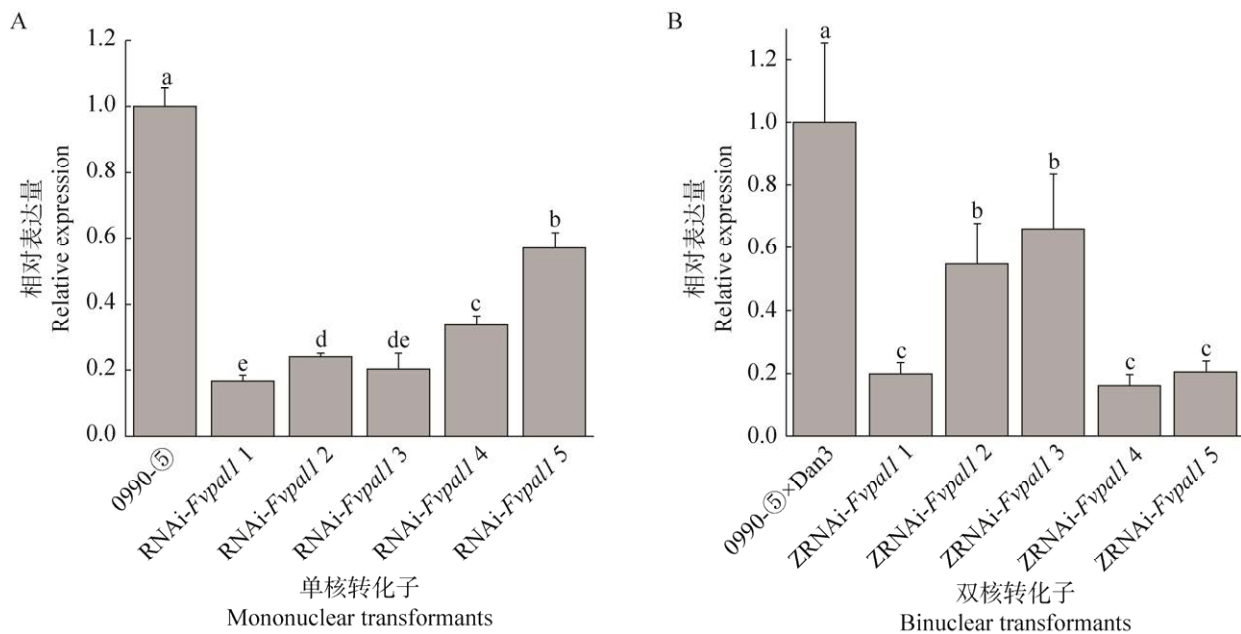


图 10 *Fvpal1* 在单核转化子和双核转化子中的表达水平 A: *Fvpal1* 在对照菌株 0990-⑤和单核转化子 RNAi-*Fvpal1* 1-5 的表达量; B: *Fvpal1* 在 0990-⑤×Dan3 and binuclear transformants ZRNAi-*Fvpal1* 1-5 的表达量. 标有不同字母表示菌株间存在显著差异($P<0.05$), 标有相同字母表示菌株间不存在显著差异($P>0.05$), 下同

Fig. 10 Expression level of *Fvpal1* gene. A: The expression level of *Fvpal1* gene in 0990-⑤ and mononuclear transformants RNAi-*Fvpal1* 1-5; B: The expression level of *Fvpal1* gene in 0990-⑤×Dan3 and binuclear transformants ZRNAi-*Fvpal1* 1-5. Labeling with different letters indicates significant differences between strains ($P<0.05$), while labeling with the same letter indicates no significant differences between strains ($P>0.05$). The same below.

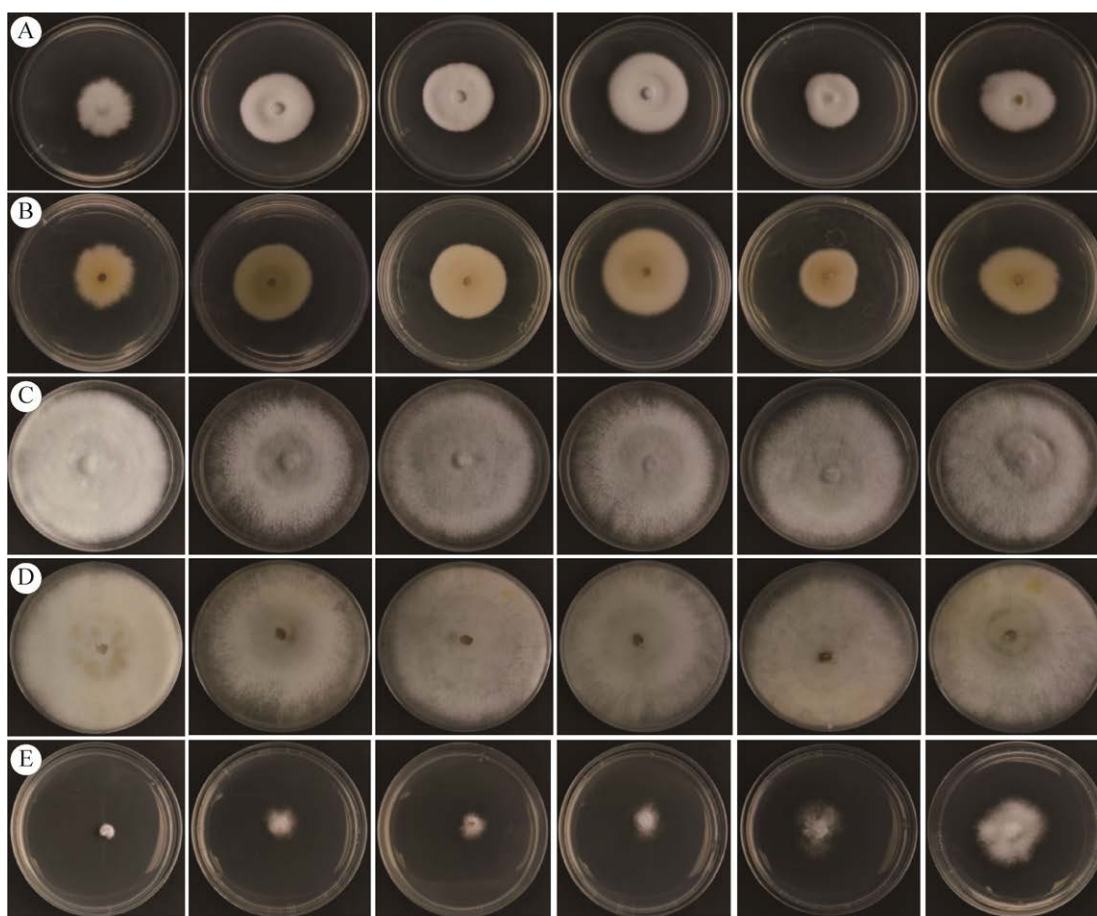


图 11 菌落形态观察结果(培养 13 d) A: 对照菌株和单核转化子在 PDA 培养基上的生长情况(正面); B: 对照菌株和单核转化子在 PDA 培养基上的生长情况(背面), 从左到右依次为: 0990-⑤、RNAi-*Fvpal1* 1、RNAi-*Fvpal1* 2、RNAi-*Fvpal1* 3、RNAi-*Fvpal1* 4、RNAi-*Fvpal1* 5; C: 对照菌株和双核转化子在 PDA 培养基上的生长情况(正面); D: 对照菌株和双核转化子在 PDA 培养基上的生长情况(背面); E: 对照菌株和双核转化子菌株在 PDA 培养基(含 7 mg/L Hyg)上的生长情况(正面), 从左到右依次为: 0990-⑤×Dan3、ZRNAi-*Fvpal1* 1、ZRNAi-*Fvpal1* 2、ZRNAi-*Fvpal1* 3、ZRNAi-*Fvpal1* 4、ZRNAi-*Fvpal1* 5

Fig. 11 Observation of colony morphology (cultured 13 d). A: The growth of control strain and mononuclear transformants in the PDA medium (obverse); B: The growth of control strain and mononuclear transformants in the PDA medium (reverse), from left to right: 0990-⑤, RNAi-*Fvpal1* 1, RNAi-*Fvpal1* 2, RNAi-*Fvpal1* 3, RNAi-*Fvpal1* 4 and RNAi-*Fvpal1* 5; C: The growth of control strain and binuclear transformants in the PDA medium (obverse); D: The growth of control strain and binuclear transformants in the PDA medium (reverse); E: The growth of control strain and binuclear transformants in a PDA medium (including 7 mg/L Hyg) (obverse), from left to right: 0990-⑤×Dan3, ZRNAi-*Fvpal1* 1, ZRNAi-*Fvpal1* 2, ZRNAi-*Fvpal1* 3, ZRNAi-*Fvpal1* 4 and ZRNAi-*Fvpal1* 5.

双核转化子菌株在 PDA 培养基上, 5 个双核转化子菌株 ZRNAi-*Fvpal1* 较对照菌株 (0990-⑤×Dan3)相比, 菌丝量较为稀疏, 尖端菌丝的长势较弱(图 11C, 11D); 菌株 ZRNAi-*Fvpal1*

1、ZRNAi-*Fvpal1* 2 和 ZRNAi-*Fvpal1* 3 的菌丝增长速度显著快于出发菌株 0990-⑤×Dan3 (图 12B)。对照菌株(0990-⑤×Dan3)和出发菌株 0990-⑤一样, 在菌丝尖端周围可分泌出带颜色的物质, 但

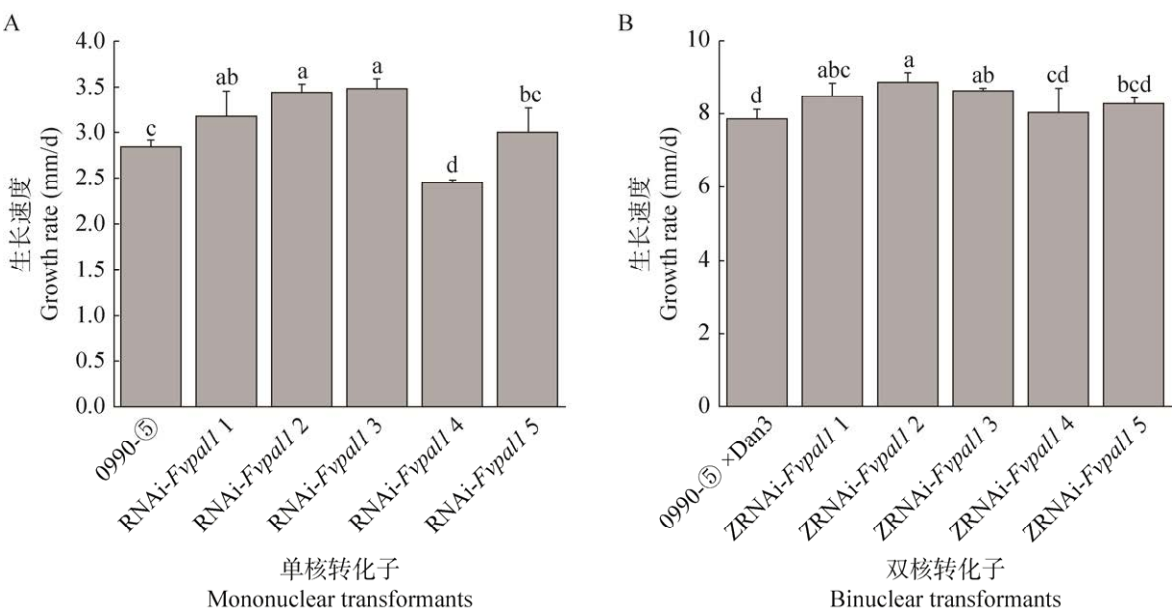


图 12 菌丝在 PDA 培养基中的生长速度 A: 对照菌株 0990-⑤和单核转化子 RNAi-*Fvpal1* 1–5 的菌丝生长速度; B: 对照菌株 0990-⑤×Dan3 和双核转化子 ZRNAi-*Fvpal1* 1–5 的菌丝生长速度

Fig. 12 Mycelial growth rate in PDA medium. A: Mycelial growth rate of 0990-⑤ and mononuclear transformants RNAi-*Fvpal1* 1–5; B: Mycelial growth rate of 0990-⑤×Dan3 and binuclear transformants ZRNAi-*Fvpal1* 1–5.

颜色浅于出发菌株 0990-⑤，但也符合黄白杂交而减少了带颜色物质产生的遗传规律。与对照菌株(0990-⑤×Dan3)相比，5 个双核转化子的菌丝尖端周边分泌出的物质颜色较对照菌株(0990-⑤×Dan3)更浅。此外，5 个双核转化子都能在含 7 mg/L Hyg 的 PDA 培养基上生长，说明出发菌株 0990-⑤中的 *Fvpal1* 基因的干扰效果在杂交菌株中依然发挥作用。

2.8 PAL 酶活测定结果

与出发菌株 0990-⑤相比，单核转化子 RNAi-*Fvpal1* 1–5 菌丝的 PAL 酶活分别下降了 41.58%、13.45%、34.85%、40.55%、14.41% (图 13A)。双核转化子 ZRNAi-*Fvpal1* 1–5 菌丝的 PAL 与对照菌株(0990-⑤×Dan3)相比也均有所下降,其中 ZRNAi-*Fvpal1* 1、ZRNAi-*Fvpal1* 2、ZRNAi-*Fvpal1* 3、ZRNAi-*Fvpal1* 5 分别显著下降 36.05%、21.00%、51.39%、27.70% (图 13B)。综上所述，经 RNAi 后的金针菇中 *Fvpal1* 基因影响了菌株的 PAL 酶活。

2.9 双核转化子在木屑培养基中的生长情况

双核转化子在木屑培养基中培养 40 d 的生长情况见图 14，这 6 个菌株在栽培袋中菌丝均分泌出了黄褐色物质，对照菌株(0990-⑤×Dan3)菌丝分泌出的黄褐色物质颜色最深，且所占体积最大，说明对出发菌株 0990-⑤进行 *Fvpal1* 基因的 RNAi 后再与 Dan3 杂交，能在出菇前的菌丝培养阶段有效抑制菌丝周围黄褐色物质的生成。

2.10 双核转化子在工厂化栽培条件下的子实体情况

双核转化子在同等工厂化栽培条件下，子实体生长情况见图 15，出发菌株 9900-⑤的双核菌株 0990、对照菌株(0990-⑤×Dan3)、杂交菌株 (0990-②×Dan3)以及双核转化子 ZRNAi-*Fvpal1* 1 和 ZRNAi-*Fvpal1* 2 的子实体颜色均为黄色，ZRNAi-*Fvpal1* 3–5 未出菇。其中双核转化子 ZRNAi-*Fvpal1* 1 和 ZRNAi-*Fvpal1* 2 的子实体颜色浅于对照菌株(0990-⑤×Dan3)，菌株 0990 颜

色最深。说明出发菌株 0990-⑤进行 *Fvpal1* 基因的 RNAi 后再与 *Dan3* 杂交，双核转化子的

子实体颜色与菌丝培养时分泌物颜色的结果一致。

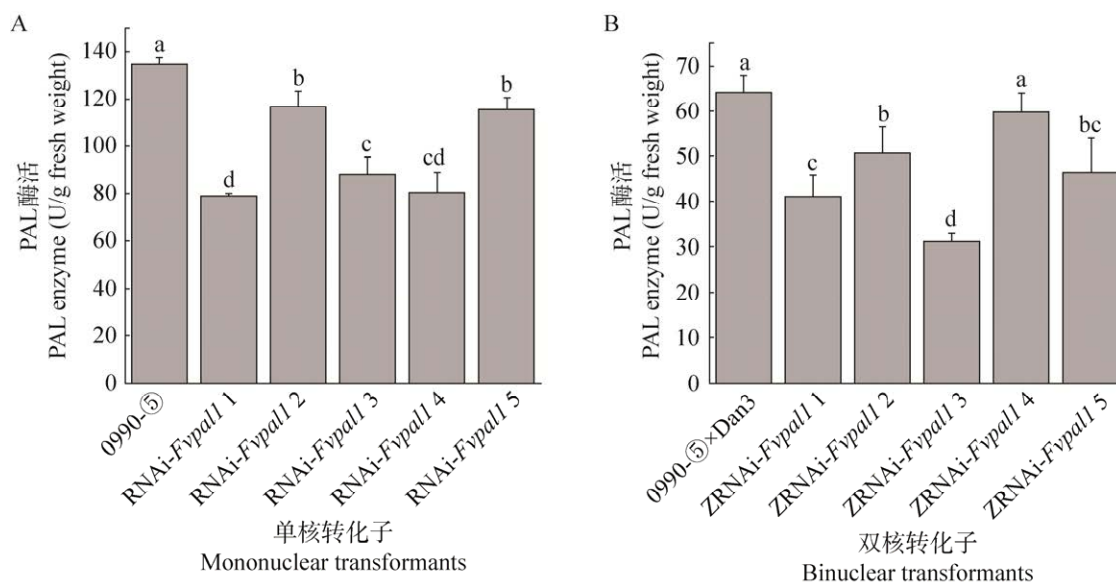


图 13 菌丝的 PAL 酶活 A: 对照菌株 0990-⑤和单核转化子 RNAi-*Fvpal1* 1–5 菌丝的 PAL 酶活; B: 对照菌株 0990-⑤×*Dan3* 和双核转化子 ZRNAi-*Fvpal1* 1–5 菌丝的 PAL 酶活

Fig. 13 PAL enzyme activity of mycelium. A: PAL enzyme activity of 0990-⑤ and mononuclear transformants RNAi-*Fvpal1* 1–5; B: PAL enzyme activity of 0990-⑤×*Dan3* and binuclear transformants ZRNAi-*Fvpal1* 1–5.



图 14 双核转化子在木屑培养基中的生长情况 从左到右依次为 0990-⑤×*Dan3*、ZRNAi-*Fvpal1* 1、ZRNAi-*Fvpal1* 2、ZRNAi-*Fvpal1* 3、ZRNAi-*Fvpal1* 4 和 ZRNAi-*Fvpal1* 5

Fig. 14 Growth of binuclear transformants in sawdust medium. From left to right: 0990-⑤×*Dan3*, ZRNAi-*Fvpal1* 1, ZRNAi-*Fvpal1* 2, ZRNAi-*Fvpal1* 3, ZRNAi-*Fvpal1* 4 and ZRNAi-*Fvpal1* 5.

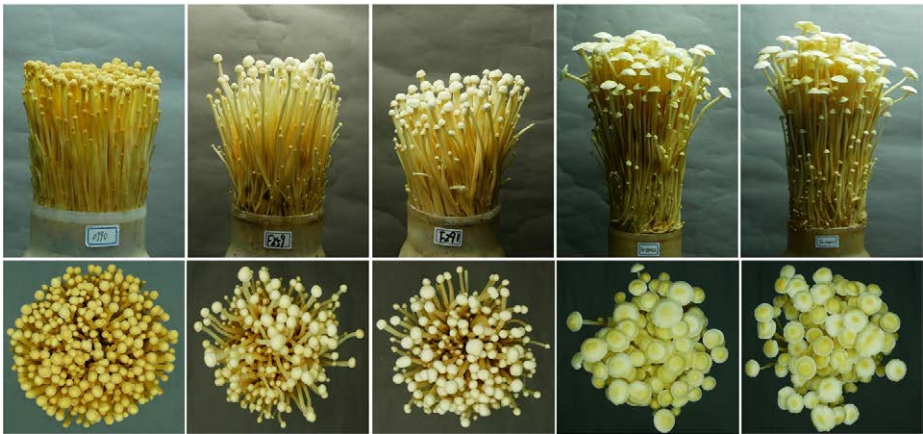


图 15 对照菌株和双核转化子在工厂化栽培条件下子实体生长情况 从左到右依次为 0990、0990-⑤×Dan3、0990-②×Dan3、ZRNAi-*Fvpal1* 1 和 ZRNAi-*Fvpal1* 2

Fig. 15 The proliferation of fruiting bodies of the reference strain and the binucleate transformant under industrial cultivation conditions. From left to right: 0990, 0990-⑤×Dan3, 0990-②×Dan3, ZRNAi-*Fvpal1* 1 and ZRNAi-*Fvpal1* 2.

3 讨论

在植物中,由苯丙氨酸的碳链通过多分支苯丙类生物合成途径合成的苯丙类化合物在宿主抵御病原体的过程中具有广泛的生物功能,而苯丙氨酸解氨酶基因则是苯丙氨酸代谢途径的关键限速酶(Kong 2015; Zhang *et al.* 2023; Augustine *et al.* 2024)。PAL 是花青素合成途径的第一个关键酶。在花生中, PAL 的表达可能与花生种皮花青素的形成有关,但 PAL 的表达量与种皮颜色深浅之间的关系尚不明确(Fan *et al.* 2022);芒果果皮花色苷含量与 PAL 的表达密切相关,与红色芒果(贵妃)相比,青色芒果(贵旗)和黄色芒果(京黄)在成熟过程中花色苷产量较低是由于 PAL 酶在翻译水平上活性降低所致。在芒果中,果实的颜色变化很有可能是花青素代谢途径中 PAL 基因突变的结果(李海芬等 2017)。

本研究成功获得了出发菌株 0990-⑤的 RNAi 阳性转化子,发现 *Fvpal1* 基因与出发菌株 0990-⑤的菌丝生长速度和菌丝的 PAL 酶活相关。当 *Fvpal1* 基因被干扰后,单核转化子 RNAi-*Fvpal1* 1、RNAi-*Fvpal1* 2 和 RNAi-*Fvpal1*

3 的菌丝生长速度明显变快,经 qRT-PCR 检测发现转化子的 *Fvpal1* 基因显著下调,相应的 PAL 酶活性也有不同程度的下降。5 个单核转化子分别与单核菌株 Dan3 杂交后获得的双核转化子中, ZRNAi-*Fvpal1* 1、ZRNAi-*Fvpal1* 2 和 ZRNAi-*Fvpal1* 3 的菌丝生长速度也明显变快,所有菌株的 qRT-PCR 结果显示 *Fvpal1* 基因均显著下调,相应的 PAL 酶活性也均低于对照菌株 (0990-⑤×Dan3)。结果表明 *Fvpal1* 基因可能对金针菇菌丝的生长速度具有负调控作用,而对深褐色色素的合成具有正调控作用。

本研究发现黄色与白色金针菇菌丝的 PAL 酶活有显著差异,且 *Fvpal1* 基因对金针菇菌丝周围分泌物质和子实体的颜色具有一定的影响,研究结果为金针菇 *Fvpal1* 基因与其子实体颜色相关提供了初步证据。后续将继续开展双核转化子和对照菌株(0990-⑤×Dan3)的出菇实验,验证菌株 RNAi 后对子实体颜色的影响。同时以黄色菌株的另一个单核体 0990-②为出发菌株,与白色的单核体 Dan3 和该菌株另一个核进行配对,以进一步对 *Fvpal1* 基因的功能进行验证。因为对 *Fvpal1* 基因与子实体颜色的研究不能仅停留

在菌丝体阶段,分析双核转化子与对照菌株的子实体菌盖和菌柄颜色的差别也是证明 *Fvpal1* 基因与金针菇子实体颜色相关最有力的证据。此外,还需对金针菇 *Fvpal1* 基因进行过表达,从正反两面对 *Fvpal1* 基因的功能进行研究;还可对该基因进行完全敲除,验证敲除后的金针菇菌丝不分泌黄褐色物质,以及子实体颜色为白色。Sakamoto *et al.* (2017)提出苯丙氨酸解氨酶(PAL)与酪氨酸酶和漆酶协同参与色素的形成,因此,还需继续挖掘和鉴定与金针菇子实体颜色相关的其他生物合成基因,如酪氨酸酶和漆酶,并构建其他表达差异显著关键酶的 RNAi 突变体,以期揭示金针菇子实体颜色形成的遗传规律和调控机制。

作者贡献

陆欢:论文撰写;沈玲、刘建雨:数据分析;尚晓冬:论文构思和指导;王瑞娟:论文审核和编辑写作;谭琦:论文指导;唐桂容:数据验证和审核。

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]

- Augustine L, Varghese L, Kappachery S, Ramaswami VM, Surendrababu SP, Sakuntala M, Thomas G, 2024. Comparative analyses reveal a phenylalanine ammonia-lyase dependent and salicylic acid mediated host resistance in *Zingiber zerumbet* against the necrotrophic soft rot pathogen *Pythium myriotylum*. *Plant Science*, 340: 111972
- Dai YC, Yang ZL, 2018. Notes on the nomenclature of five important edible fungi in China. *Mycosystema*, 37(12): 1527-1577 (in Chinese)
- Dai YC, Yang ZL, Cui BK, Wu G, Yuan HS, Zhou LW, He SH, Ge ZW, Wu F, Wei YL, Yuan Y, Si J, 2021. Diversity and systematics of the important macrofungi in Chinese forests. *Mycosystema*, 40(4): 770-805 (in Chinese)
- Fan L, Shi G, Yang J, Liu G, Niu Z, Ye W, Wu S, Wang L, Guan Q, 2022. A protective role of phenylalanine ammonia-lyase from *Astragalus membranaceus* against saline-alkali stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24): 15686
- Fu Y, Yu Y, Tan H, Wang B, Peng W, Sun Q, 2022. Metabolomics reveals dopa melanin involved in the enzymatic browning of the yellow cultivars of East Asian golden needle mushroom (*Flammulina filiformis*). *Food Chemistry*, 370: 131295
- Hou L, Wang L, Wu X, Gao W, Zhang J, Huang C, 2019. Expression patterns of two pal genes of *Pleurotus ostreatus* across developmental stages and under heat stress. *BMC Microbiology*, 19: 1-6
- Hu MD, Li JW, Wang M, Liu B, Ma YC, Zhao YL, Yang XL, Cui SL, Hou MY, Jiang XX, Mu GJ, 2022. Identification and analysis of miRNA and its target genes related to anthocyanin biosynthesis in variegated testa of peanut. *Journal of Plant Genetic Resources*, 23(1): 226-239 (in Chinese)
- Im JH, Yu HW, Park CH, Kim JW, Shin JH, Jang KY, Park YJ, 2023. Phenylalanine ammonia-lyase: a key gene for color discrimination of edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Journal of Fungi*, 9(3): 339
- Kong JQ, 2015. Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering. *RSC Advances*, 5(77): 62587-62603
- Kong WS, You CH, Yoo YB, Kim GH, Kim KH, 2004. Molecular marker related to fruitbody color of *Flammulina velutipes*. *Mycobiology*, 32(1): 6-10
- Li HF, Qiu JM, Chen XP, Hong YB, Liang XQ, 2017. Differential expression of genes associated with anthocyanin synthesis in peanut cultivars with different testa color. *China Journal of Oil Crop Sciences*, 39(5): 600-605 (in Chinese)
- Lin W, Liu A, Weng C, Li H, Sun S, Song A, Zhu H, 2018. Cloning and characterization of a novel phenylalanine ammonia-lyase gene from *Inonotus baumii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 112: 52-58
- Liu LN, 2016. Study on genetic property of the color mutant of *Flammulina velutipes*. MS Thesis, Hunan Normal University, Changsha. 1-46 (in Chinese)
- Liu X, Liu TH, Wang B, Jia DH, Peng WH, He XL, 2023. Research progress of molecular biology and functional genes of *Flammulina filiformis*. *Mycosystema*, 42(1): 130-142 (in Chinese)
- Lu H, Wang RJ, Liu JY, Song CY, Shang XD, 2021. Analysis and devaluation of nutrient components of different strains of *Flammulina filiformis*. *Food & Machinery*, 37(6): 69-75, 96 (in Chinese)
- Luo Z, Gao Q, Li Y, Bai Y, Zhang J, Xu W, Xu J, 2022. *Flammulina velutipes* mycorrhizae attenuate high fat

- diet-induced lipid disorder, oxidative stress and inflammation in the liver and perirenal adipose tissue of mice. *Nutrients*, 14(18): 3830
- Lyu XM, Jiang SY, Wang L, Chou TS, Wang QJ, Meng L, Mukhtar I, Xie BG, Wang W, 2021. The *Fvclp1* gene regulates mycelial growth and fruiting body development in edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Archives of Microbiology*, 203(9): 5373-5380
- Sakamoto Y, Nakade K, Sato S, Yoshida K, Miyazaki K, Natsume S, Konno N, 2017. *Lentinula edodes* genome survey and postharvest transcriptome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(10): e02990-16
- Sharma VP, Barh A, Bairwa RK, Annepu SK, Kumari B, Kamal S, 2021. Leaves, flowerheads, green pods, mushrooms and truffles. In: Jameel M. Al-Khayri, S. Mohan Jain, Dennis V. Johnson (eds.) *Advances in plant breeding strategies: vegetable crops*, Vol. 10. Springer, Cham, Switzerland. 1-553
- Ukaegbu CI, Shah SR, Hazrulrizawati AH, Alara OR, 2018. Acetone extract of *Flammulina velutipes* caps: a promising source of antioxidant and anticancer agents. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4): 675-682
- Wang GL, Yang Y, Li GH, Yang J, Zhao EL, 2021. Research progress on the biological activities of *Flammulina velutipes* polysaccharide. *Edible Fungi of China*, 40(12): 10-13, 18 (in Chinese)
- Wang H, Guo DF, Wang X, 2021. Nutritional health function of *Flammulina velutipes* and its development and utilization status. *Edible Fungi of China*, 40(11): 11-14, 24 (in Chinese)
- Wang Y, 2020. Cross breeding of *Grifola frondosa* and study on function of its phenylalanine ammonia lyase gene. MS Thesis, Shandong Normal University, Jinan. 1-83 (in Chinese)
- Xie BG, Jiang YJ, Wu WL, 2004. Fruit-body color inheritance of *Flammulina velutipes*. *Mycosystema*, 23(1): 79-84 (in Chinese)
- Yan JJ, Chekanova JL, Liu YY, Gan BC, Long Y, Han X, Tong ZJ, Miao J, Lian LD, Xie BG, Liu F, 2022. Reactive oxygen species distribution involved in stipe gradient elongation in the mushroom *Flammulina filiformis*. *Cells*, 11(12): 1896
- Yi RR, Cao H, Pan YJ, 2007a. Monokaryons fruiting and fruit body color of *Flammulina velutipes*. *Acta Edulis Fungi*, 14(2): 33-36, 91 (in Chinese)
- Yi RR, Cao H, Pan YJ, 2007b. Genetic analysis of fruit body color in a hybrid strain of *Flammulina velutipes*. *Acta Edulis Fungi*, 14(4): 19-21, 91 (in Chinese)
- Yun YH, Koo JS, Kim SH, Kong WS, 2015. Cloning and expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene in the mycelium and fruit body of the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Mycobiology*, 43(3): 327-332
- Zhang F, Wang J, Li X, Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yu Q, Li N, 2023. Genome-wide identification and expression analyses of phenylalanine ammonia-lyase gene family members from tomato (*Solanum lycopersicum*) reveal their role in root-knot nematode infection. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1204990
- Zhao Z, Gao A, Luo R, Liu K, Yu K, 2022. The different deletion mutation in the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene affects the peel color of mango (*Mangifera indica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(7): 2301-2306

[附中文参考文献]

- 戴玉成, 杨祝良, 2018. 中国五种重要食用菌学名新注. *菌物学报*, 37(12): 1527-1577
- 戴玉成, 杨祝良, 崔宝凯, 吴刚, 袁海生, 周丽伟, 何双辉, 葛再伟, 吴芳, 魏玉莲, 员瑗, 司静, 2021. 中国森林大型真菌重要类群多样性和系统学研究. *菌物学报*, 40(4): 770-805
- 胡梦蝶, 李佳伟, 王梅, 刘彬, 马钰聪, 赵雨露, 杨鑫雷, 崔顺立, 侯名语, 蒋晓霞, 穆国俊, 2022. 花生花斑种皮花青素生物合成相关 miRNA 及其靶基因鉴定与分析. *植物遗传资源学报*, 23(1): 226-239
- 李海芬, 邱金梅, 陈小平, 洪彦彬, 梁炫强, 2017. 花生花青素合成相关基因的表达与种皮颜色关系. *中国油料作物学报*, 39(5): 600-605
- 刘丽娜, 2016. 金针菇颜色突变型的遗传属性研究. 湖南师范大学硕士论文, 长沙. 1-46
- 刘询, 刘天海, 王波, 贾定洪, 彭卫红, 何晓兰, 2023. 金针菇分子生物学和功能基因研究进展. *菌物学报*, 42(1): 130-142
- 陆欢, 王瑞娟, 刘建雨, 宋春艳, 尚晓冬, 2021. 不同品种金针菇的营养成分分析与评价. *食品与机械*, 37(6): 69-75, 96
- 王桂林, 杨宇, 李国辉, 杨洁, 赵二劳, 2021. 金针菇多糖生物活性研究进展. *中国食用菌*, 40(12): 10-13, 18
- 王慧, 郭东方, 王鑫, 2021. 金针菇的营养保健功能及开发利用现状. *中国食用菌*, 40(11): 11-14, 24
- 王艳, 2020. 灰树花杂交选育及其苯丙氨酸解氨酶基因的功能研究. 山东师范大学硕士论文, 济南. 1-83
- 谢宝贵, 江玉姬, 吴文礼, 2004. 金针菇子实体颜色的遗传规律研究. *菌物学报*, 23(1): 79-84
- 蚁瑞荣, 曹晖, 潘迎捷, 2007a. 金针菇单核出菇与子实体颜色. *食用菌学报*, 14(2): 33-36, 91
- 蚁瑞荣, 曹晖, 潘迎捷, 2007b. 金针菇杂合菌株子实体颜色遗传分析. *食用菌学报*, 14(4): 19-21, 91