

草菇低温胁迫初期应答关键通路的探究

吕贝贝^{1, 2*} 吴潇^{1, 2*} 莫芹¹ 孙宇¹ 蒋玮^{1, 2} 黄艳娜^{1, 2} 武国干^{1, 2}
宋丽莉^{1, 2} 王金斌^{1, 2} 李鹏^{1, 2} 刘刚¹ 唐雪明^{1, 2*}

①上海市农业科学院生物技术研究所 上海 201106

②上海市农业遗传育种重点实验室 上海 201106

摘 要: 本研究利用表达谱芯片技术解析了低温胁迫初期(0–120min)不同低温处理时间草菇转录组水平的变化。芯片结果分析发现在低温诱导过程中, 低温处理 20min 内变化基因的功能为单加氧酶、氧化还原酶和细胞内的氧化还原。低温处理 40min 时表达差异基因具有结合 RNA 的功能。80min 的时间段内, 基因的功能比较集中于核酸物质和能量的代谢。CYP450 的代谢途径在 20–40min、60–80min 和 100–120min 低温处理的菌丝体中均有显著性变化, 表明这一通路在草菇低温处理过程中表现活跃。基因表达趋势分析发现 34 个表达差异基因富集到显著表达趋势模型, 基因共表达网络分析发现 VVO_04066 位于网络的核心地位, 推测 VVO_04066 通过提高磷酸肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC) 的胞内水平, 促进糖蛋白和几丁质的合成, 从而完成草菇细胞的低温胁迫应答。

关键词: 草菇, 表达谱芯片, 耐低温, CYP450, VVO_04066

[引用本文] 吕贝贝, 吴潇, 莫芹, 孙宇, 蒋玮, 黄艳娜, 武国干, 宋丽莉, 王金斌, 李鹏, 刘刚, 唐雪明, 2021. 草菇低温胁迫初期应答关键通路的探究. 菌物学报, 40(5): 1074-1086

Lv BB, Wu X, Mo Q, Sun Y, Jiang W, Huang YN, Wu GG, Song LL, Wang JB, Li P, Liu G, Tang XM, 2021. Investigation of the key potential pathway involved in the early response to low temperature challenge in *Volvariella volvacea*. Mycosystema, 40(5): 1074-1086

基金项目: 上海市科委一带一路项目 (20310750500); 上海市科委社会发展科技领域重点项目 (19DZ1203802); 国家自然科学基金 (31801511); 上海市农业科学院科技支撑项目 (KJZC202008); 上海市农业科学院卓越团队 (2017 B-07) Supported by the Belt and Road Initiative Project of Shanghai Science and Technology Commission (20310750500), Key Projects of Shanghai Science and Technology Commission (19DZ1203802), the National Natural Sciences Foundation of China (31801511), Science and Technology Support Project of Shanghai Academy of Agricultural Sciences (KJZC202008), and Excellent Team of Shanghai Academy of Agricultural Sciences (2017 B-07).

* Corresponding author. E-mail: xueming70@foxmail.com; Tel: +86-021-62202746; Fax: +86-021-62202746

* Contributed equally to this work as co-first author.

Received: 2020-09-07, accepted: 2020-10-27

Investigation of the key potential pathway involved in the early response to low temperature challenge in *Volvariella volvacea*

LV Bei-Bei^{1, 2} WU Xiao^{1, 2} MO Qin¹ SUN Yu¹ JIANG Wei^{1, 2} HUANG Yan-Na^{1, 2}
WU Guo-Gan^{1, 2} SONG Li-Li^{1, 2} WANG Jin-Bin^{1, 2} LI Peng^{1, 2} LIU Gang¹
TANG Xue-Ming^{1, 2}

①Biotechnology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

②Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

Abstract: The transcriptome variations of *Volvariella volvacea* during the early stage of low temperature challenge (0–120min) were analyzed by using expression profile chip technology. Microarray analysis showed that under low temperature treatment for 20min differentially expressed genes enriched monooxygenase activity, oxidoreductase activity and oxidation-reduction process. After 40min of low temperature treatment, the differentially expressed genes enriched the function of binding RNA. In the period of 80min, genes concentrated on the metabolism of nucleic acid and energy. The metabolic pathway of CYP450 was significantly changed during the induction of low temperature (20–40min, 60–80min and 100–120min), indicating that this pathway was active during the low-temperature treatment and CYP450 might play an important role. Gene expression trend analysis showed that 34 differentially expressed genes were classified in the significant expression trend model. Gene co-expression network analysis results show that VVO_04066 is located in the core of the network, and it may improve the intracellular level of phosphoinositol specific phospholipase C (PI-PLC) and promote the synthesis of glycoprotein and chitin, completing the low temperature stress response of *Volvariella volvacea*.

Key words: *Volvariella volvacea*, cDNA microarray, low temperature resistance, CYP450, VVO_04066

草菇又称为中国菇，是一种喜高温高湿的腐生真菌，生产周期短，成本低，在热带和亚热带高温多雨地区广为栽培（Chang 1975）。草菇以鲜销为主，因其口感好，味道鲜美、肉质细腻，营养丰富，食用和药用价值很高，深受消费者青睐。然而草菇在生产和销售过程中存在严重缺陷，即草菇的子实体在低温条件下会液化变质，导致无法食

用（Chang 1993）。因此，草菇的低温自溶现象是草菇商业化生产的关键制约因素，解析草菇低温自溶的分子机理是目前草菇的研究热点（姜威等 2014；吕贝贝等 2015）。

由于草菇基因组信息未知和研究技术受限，关于草菇低温自溶的研究取得成果也少之又少。*cor1* 和 *cor4* 基因与草菇的低温自溶现象具有相关性（乔娜 2009a, 2009b）。

研究成果基本都是单个基因与低温自溶现象的关系,目前还没有在草菇低温胁迫初期的代谢途径或者网络调控方面取得相关成果。本研究是在 Bao *et al.* (2013) 公布的草菇全基因组信息的基础上,利用表达谱芯片技术,解析不同低温处理时间的草菇的整个转录组信息,分析草菇低温自溶过程中发生的 mRNA 水平变化规律,同时为解决草菇低温自溶问题提供全面的理论基础,为解决草菇不耐低温储藏问题提供理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试草菇菌株 V23,由上海市农业科学院食用菌菌种保藏中心提供。

1.2 方法

1.2.1 草菇菌丝的培养:取保藏的出发菌株 V23 适量接种于 PDA 固体培养基上活化 3–5d,等菌丝布满平板,挑取适量接种于 PDA 液体培养基中, $(32\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 条件下静止培养 2–5d。为保证三角瓶中有足够的氧气,每天早晚各摇动 1 次 (Chen *et al.* 2003; 吕贝贝等 2015)。

1.2.2 草菇低温的处理:以草菇 V23 为实验材料,将 V23 菌丝接种于 PDA 培养基中 32°C 培养 72h,培养好的菌丝分别进行 4°C 低温处理,处理时间分别为 0、20、40、60、80、100、120min,提取不同处理的菌丝 RNA 样品,分别命名为 1、2、3、4、5、6、7。样品交由芯片公司进行后续的表达谱芯片实验,样品质检用 Agilent 2100 系统对样品总 RNA 进行质量检测 and 定量。图像扫描用 Agilent 激光共聚焦扫描仪对杂交结束后的芯片进行扫描。对杂交信号值进行扣本底、标准化等数据处理。

1.2.3 草菇菌丝 RNA 的提取和 cDNA 的合成:

草菇菌丝转接于 PDA 培养基中, $(32\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 条件下静止培养 4d,将培养好的菌丝用无菌纱布进行过滤,吸水纸吸干表面水分后,液氮处理后充分研磨,按照 Ng *et al.* (2005) 的方法运用 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA) 提取总 RNA, cDNA 的合成参照 Bao *et al.* (2013) 的方法,每份菌丝材料进行 3 次独立实验来完成 RNA 的提取和 cDNA 的合成。

1.2.4 表达谱芯片:芯片杂交试验采用定制的 Agilent 基因表达谱芯片,包含 11 097 条草菇基因信息,芯片杂交及数据处理的由上海国家工程研究中心完成。其中样品 RNA 的提取和纯化利用 QIAGEN RNeasy^R Mini kit (QIAGEN 公司,德国),利用 Cy3 荧光染料 (GE healthcare) 标记样品组和对照组样品 cDNA,每组样品设置 3 个生物学重复。杂交清洗后芯片用 Agilent G2565BA (Agilent 公司,美国) 激光扫描仪进行扫描,采用 Agilent G2585BA (Agilent 公司,美国) Microarray Scanner System 图像分析软件对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号,然后用 Lowess 方法对芯片上的数据进行归一化;最后以差异为 2 倍且 $P<0.05$ 的标准来筛选差异表达基因。

1.2.5 数据分析:差异表达基因功能分类基因芯片数据利用 SAS 在线数据库 (<http://sas.ebiosevice.com/>) 进行分析。根据差异表达基因探针代码,在 SAS 系统获得基因注释,并运用软件 <http://geneontology.org/> 和 <https://www.kegg.jp/> 进行基因本体论 (GO) 和通路 (KEGG, Pathway) 的生物学注释。运用软件 <https://www.gcbi.com.cn> 进行基因表达趋势分析。

基因共表达网络分析:利用 R 软件包进行 WGCNA (权重共表达网络分析),纯文本文件导入到 Cytoscape 软件结合 MCODE 插件计算 K-core 值。

2 结果与分析

2.1 芯片质量检测

箱线图 (box-whisper plot) 是由单荧光芯片的原始数据经过均一化和对数转换以后绘制而成, 用于评估芯片数据的分布和分散程度。样品的中位数差异很小, 分布于 8 和 10 之间且 V 值分布稳定 (图 1), 说明样品之间的数据分布均匀。

散点矩阵图 (scatter plot and matrix plot) 是由单荧光芯片的原始数据经过标准化处理, 将标准化数据进行对数转换, 转化后的数据绘制在二维直角坐标系中。散点矩阵图能够反映数据的总体分布集中趋势。荧光芯片数据两两比较, 散点图列阵绘制成矩阵图。每个矩阵图中 99.5% 以上的点都落在 $Y=X$ 的直线周围, 表明两两数据之间稳定性强, 数

据整体分布均匀 (图 2)。

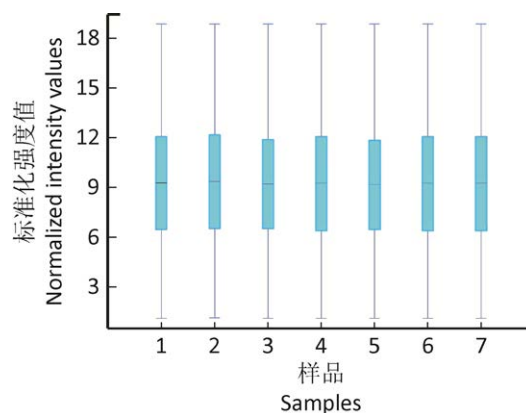


图 1 芯片结果箱线图分析 横坐标为样品编号, 纵坐标为标准化强度值, 青色矩形的中间线即中位线
Fig. 1 Box-whisper plot analysis of the gene chip results of samples. The abscissa is the sample number, the ordinate is the normalized intensity values, and the middle line of the cyan rectangle is the median line.

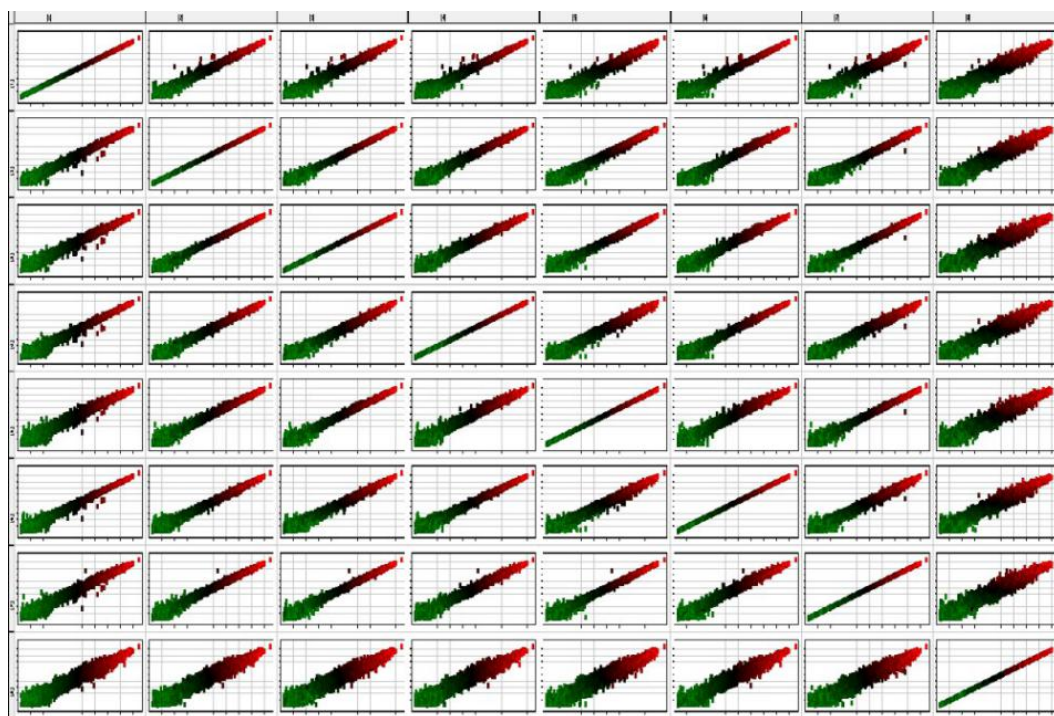


图 2 各样品数据的散点矩阵图 每一个点代表芯片上的探针点, 横坐标表示该点在样品芯片中标准化以后的信号值, 纵坐标表示该点在对照芯片中标准化以后的信号值

Fig. 2 Scatter plot and matrix plot analysis of the gene chip results of samples. Each point represents the probe point on the chip, the abscissa represents the signal value of the point after standardization in the sample chip, and the ordinate represents the signal value after the point is standardized in the control chip.

2.2 表达差异基因的定量 PCR 实验验证

为了验证芯片数据的可靠性, 参照吕贝贝等 (2015) 的方法进行了表达基因的定量 PCR 实验。以微管蛋白 (tubulin, TUB) 基因作为内参 (姜威等 2014; 吕贝贝等 2015), 随机选取 7 个基因进行检测 (表 1), 结果表明所选基因的表达模式与芯片结果一致, 说明芯片结果具有生物学意义的可重复性, 结果可信, 可进行下一步分析。

2.3 差异基因分析

表达谱芯片的分析结果发现, 与对照组相比 (样品 1, 低温处理 0min), 低温处理 120min 内 (样品 2-7), 共有 2 676 个基因发生了 2.0 倍以上的变化, 其中 1 771 个基因发生了上调表达, 905 个基因下调表达。样品 5 即低温处理 80min 时草菇菌丝中发生上调和

下调变化的基因最多, 分别为 627 和 302 个基因。但是当低温处理时间延长 20min 后, 草菇菌丝 (样品 6) 中的上调表达基因和下调表达基因的数量降为最低值, 仅为 56 和 34。这表明随着低温处理时间的增加, 草菇菌丝中发生变化的基因数量并不是呈现单一趋势的增加或者减少, 而是发生了复杂的动态变化 (图 3)。

2.4 表达差异基因 GO 功能分析

以 2 676 个表达差异基因为研究对象, 进行了基因功能 GO (gene ontology) 注释 (图 4) 并筛选出显著性富集的基因功能 ($P<0.05$ 且 $FDR<0.05$), 结果显示, 低温处理 20min (样品 2) 内表达差异基因的功能有 3 类, 分别为单加氧酶、氧化还原酶活性和参与细胞内的氧化还原过程。低温处理 40min 时 (样品 3)

表 1 实时荧光定量 PCR 所选基因检测结果与芯片结果比较

Table 1 The comparison of real-time RT-PCR assay and corresponding gene chip result

探针编号 Probe No.	基因编号 Gene No.	基因注释 Gene annotation	引物序列 Primer sequence (5'-3')	相对表达倍数*	
				Relative expressed changed fold*	
				实时定量 PCR Real time RT-PCR	基因芯片 Gene chip
CUST_32_P1428615443	VVO_00032	Conserved	CATTGTTCTTCTTCTCATCT	0.7	0.7
		hypothetical protein	ATTGCGAATGAAAGTGCTCG		
CUST_109_P1428615443	VVO_00109	Sulfate anion	ACTGAAGAAGAAATCCGCAAGA	0.8	0.8
		transporter	TGAAGCCAAAATCAAATGAG		
CUST_3805_P1428615443	VVO_03805	Conserved	CTGATAACGACGAATTGCA	1.5	1.5
		hypothetical protein	GCAAATCGCGCATCTCG		
CUST_3805_P1428615443	VVO_03805	AMP binding	CTGAATCATTCTGAGTGGGTT	0.3	0.3
		protein	AGACCTTGTCGTCGTTTAT		
CUST_4018_P1428615443	VVO_04018	Conserved	TGTGATGATTGGCTCCTATTCTG	0.5	0.5
		hypothetical protein	CCACCGTTGTTCTGTTGTCTGT		
CUST_8579_P1428615443	VVO_08579	Nucleosome	CGTTGGCTCTCTCAGGCTTGTGA	1.2	1.2
		assembly protein	CATTACGACGAAAAAGGCATGGT		
CUST_8067_P1428615443	VVO_08067	Ubiquitin family	ACATAGATATGGCAGGAGT	0.5	0.5
		protein	CAGCTCTGGATTCCGTAACAT		

注: * 表达差异倍数大于 1 表示基因表达上调, 小于 1 表示基因表达下调

Note: *Represents that if the fold change of the differently expressed gene was greater than 1, the gene was up-regulated and if the fold change of the differently expressed gene was less than 1, the gene was down-regulated.

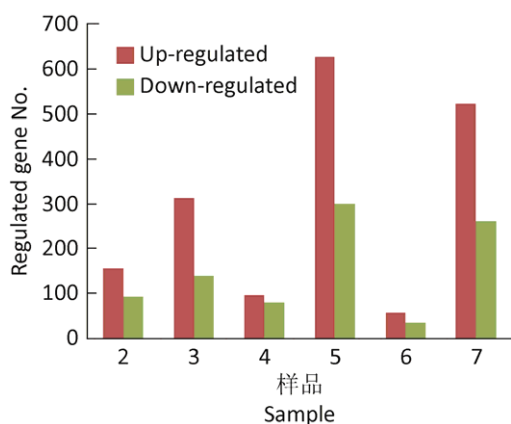


图 3 各样品中表达差异基因数量 红色柱形表示上调表达基因，绿色柱形表示下调表达基因

Fig. 3 The number of differentially expressed genes between different samples. The red column indicates the up-regulated genes and the green column indicates the down-regulated genes.

表达差异基因具有结合 RNA 的功能。低温处理 80min 的时间段内（样品 5），表达差异基

因的功能比较集中于核酸物质和能量的代谢。综合 P 值与 FDR 值因素，分析发现低温处理 20min（样品 2）内表达差异基因富集到的单加氧酶这一功能的显著性最高（ $P=0.00023$ ， $FDR=0.04$ ）。单加氧酶是生物体中的重要酶系，能够催化一个氧原子，属于氧化酶系。单加氧酶参与体内糖类、蛋白质和次生代谢物质等重要物质的形成，与药物和毒物的代谢关系密切。样品 2 中 5 个表达差异基因富集到该功能，分别为 VVO_01172、VVO_04124、VVO_06096、VVO_06098 和 VVO_06424，其中 VVO_01172 表达差异倍数最大（Fold change=2.3），编码蛋白质具有酪氨酸酶中心结构域。VVO_01172 表达水平随着处理时间的延长而呈上升趋势。由此推测 VVO_01172 在草菇低温胁迫的初期（20min）开始就可能通过氧化作用完成低温胁迫的应答反应。

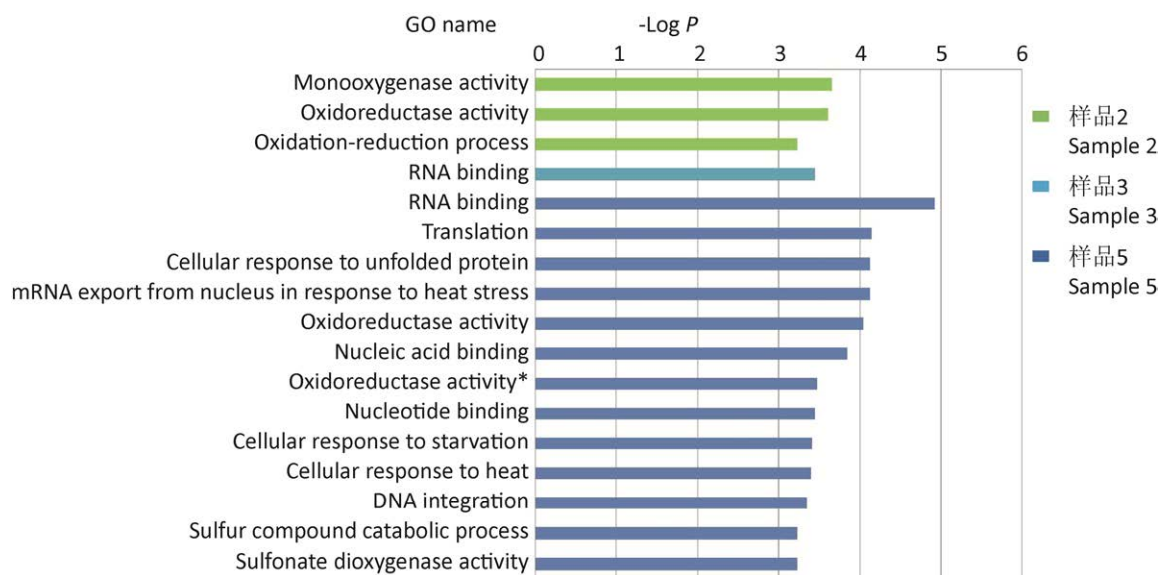


图 4 样品中表达差异基因的 GO 注释 左侧 GO 名称；右侧为 $-\log P$ ，其中绿色柱形表示与样品 1 相比，样品 2 中表达差异基因所富集到的 GO；青色柱形表示与样品 1 相比，样品 3 中表达差异基因所富集到的 GO；蓝色柱形表示与样品 1 相比，样品 5 中表达差异基因所富集到的 GO

Fig. 4 GO analysis of differentially expressed genes of samples. Left column is GO name, the right column is $-\log P$. Green column represents the GO enriched by the differential gene expressed in sample 2, which is compared with sample 1; cyan column represents the GO enriched by the differential gene expressed in sample 3, which is compared with sample 1; the blue column represents the GO enriched by the differential gene expressed in sample 5, which is compared with sample 1.

为了具体分析随低温处理时间的增加,草菇转录组具体变化情况。针对两个相邻样品之间表达差异倍数达 2 以上或者 0.5 以下且 $P<0.05$ 的差异基因进行了筛选。结果发现样品 6 与样品 5 相比时 (6VS5) 表达差异基因数目最多高达 4 165 个基因, 占草菇转录组 (11 142 个基因) 的 37.4%; 差异基因主要富集在核糖体 (ko03010: ribosome) 和剪切体 (ko03040: spliceosome) 两个代谢通路。VVO_00750 和 VVO_09521 分别是这两个代谢通路中的唯一基因, 由此推测在低温胁迫 80–100min 过程中, VVO_00750 和 VVO_09521 分别通过影响细胞内蛋白质合成和 RNA 剪切等生物学功能, 进而推动影响草菇对低温的胁迫应答。

样品 7 与样品 6 之比 (7VS6) 次之, 差异基因数目为 3 775, 占转录组总基因的 33.9%。差异基因主要富集在 ko00980: Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, 富集到该通路中有 11 个基因, 分别为 VVO_03319、VVO_04821、VVO_05531、VVO_05577、VVO_06098、VVO_08939、VVO_08969、VVO_09309、VVO_09402、VVO_10513 和 VVO_10641, 其中 VVO_03319 是表达差异最大的基因 (Fold change=2.5), 属于谷胱甘肽转移酶编码基因, VVO_03319 在低温处理 0–100min 时间内表达差异不显著, 低温处理 100min 后表达水平显著上升, 已有研究表明谷胱甘肽转移酶在低温胁迫诱导的氧化损伤中发挥重要作用 (宋长芹等 2010), 由此推测 VVO_03319 可能在修复低温造成的细胞损伤中发挥作用。

在低温处理草菇菌丝前 2h 的过程中在 80–120min 时 RNA 发生改变的基因数目较多 (图 5)。此外发现一个有趣的现象, 在样品 5 与样品 4 的对比 (5VS4) 中发现差异基因的数目是除 3VS2 外的 5 组数据中最低的, 但却是基因功能的注释分类-GO 数目最多的

一组 (数值为 104), 这说明在低温处理菌丝 20–40min 的时间段内基因参与的功能种类较其他时间段多。

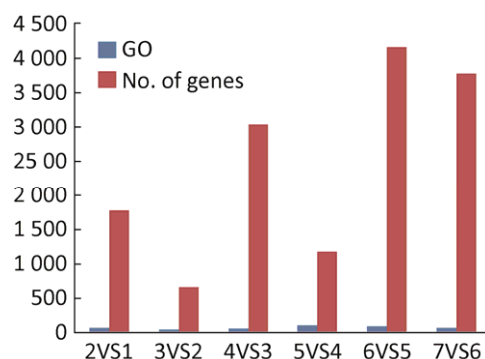


图 5 前后样品比较差异基因及其 GO 注释 横坐标表示相互比较的两个相邻样品, 纵坐标表示两个样品中表达差异基因的数量 (红色柱形) 和表达差异基因所富集的 GO 数目 (蓝色柱形)

Fig. 5 The GO analysis of the differentially expressed genes between the neighboring samples. The abscissa represents two adjacent samples compared with each other, and the ordinate represents the number of differentially expressed genes (red column) in the two samples and the number of GO enriched by differentially expressed genes (blue column).

2.5 差异基因 KEGG 分析

与样品 1 相比, 各样品中表达差异基因的 KEGG 分析 ($P<0.05$) 结果发现低温处理不同时间的样品中表达差异基因富集的 KEGG 差异较大 (图 6)。样品 2 中表达差异基因主要富集在苯丙氨酸的代谢途径中。样品 3 中表达差异基因则主要集中在外源物质的 CYP450、色氨酸和维生素 A 的代谢, 样品 4 中表达差异基因没有发生显著性富集的 KEGG, 其变化基因参与的主要通路还有待于进一步研究。其中, 样品 7 中表达差异基因富集到的注释种类最多 (高达 9 种), 其中主要包括外源物质的 CYP450 与酪氨酸、组氨酸、硫等物质的代谢和蛋白酶体。CYP450 的代谢

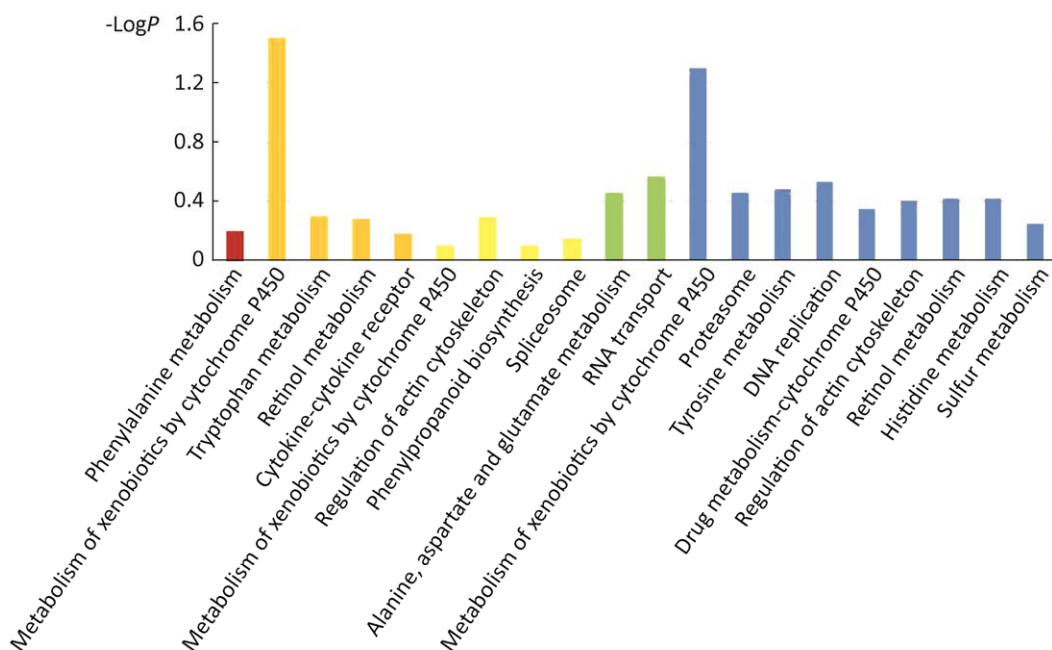


图 6 各样品中表达差异基因的 KEGG 分析 横坐标为与样品 1 相比, 各样品中表达差异基因所富集的 KEGG 名称, 纵坐标为各 KEGG 富集过程中 P 值的相关数 $-\text{Log}P$, 其中红色柱形表示与样品 1 相比, 样品 2 中表达差异基因所富集到的 KEGG; 橙色柱形表示与样品 1 相比, 样品 3 中表达差异基因所富集到的 KEGG; 黄色柱形表示与样品 1 相比, 样品 5 中表达差异基因所富集到的 KEGG; 绿色柱形表示与样品 1 相比, 样品 6 中表达差异基因所富集到的 KEGG; 蓝色柱形表示与样品 1 相比, 样品 7 中表达差异基因所富集到的 KEGG

Fig. 6 KEGG analysis of differentially expressed genes of samples. The abscissa is the name of KEGG enriched by differentially expressed genes in each sample compared with sample 1, and the ordinate is the correlation number $-\text{Log}P$ of P value in each KEGG enrichment process, among them, the red column represents the KEGG enriched by differentially expressed genes in sample 2, which is compared with sample 1; the orange column represents the KEGG enriched by differentially expressed genes in sample 3, which is compared with sample 1; the yellow column represents the KEGG enriched by differentially expressed genes in sample 5, which is compared with sample 1; and the green column represents the KEGG enriched by differentially expressed genes in sample 6, which is compared with sample 1; the blue column shows KEGG enriched by differentially expressed genes in sample 7, which is compared with sample 1.

这一途径不仅仅在样品 3 中出现表达差异基因, 在样品 5 和 7 中表达差异基因均有富集 (图 7)。这表明这一通路在草菇低温处理过程中表现活跃, 可能发挥了重要的功能。关于 CYP450 代谢这一通路的富集基因分析, 发现样品 3 有 7 个表达差异基因富集, 样品 5 和样品 7 中分别有 8 个和 9 个表达差异基因富集, 基因 VVO_06098 同时富集在 3 个样品的表达差异基因群体。低温胁迫处理 2h 过程中,

VVO_06098 转录表达水平呈上升趋势。VVO_06098 属于细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 编码基因, 细胞色素 P450 是一种广泛存在的多功能氧化酶系, 参与生物体的生长、免疫和次生物质的代谢等重要生命活动。由此推测低温胁迫时, VVO_06098 可能通过增强细胞色素 P450 的酶系活性进行草菇的低温应答。

除此之外, 在各样品表达差异基因中均

富集在氨基酸的代谢通路中，但是富集到代谢氨基酸的种类各不相同，表明在不同的时间段内，不同的氨基酸代谢可能在草菇低温处理过程中发挥了举足轻重的作用。

2.6 基因表达趋势分析

为了分析在低温胁迫初期草菇编码基因表达的趋势特征，将筛选到的 2 676 个表达差异基因在低温处理 2h 内 7 个不同时间点的表达水平进行表达趋势分析。将相同变化特征的基因集中在一种变化趋势中，结果发现编码基因可以归结到 80 个表达趋势模型（profile）（图 8），其中 12 个为显著变化

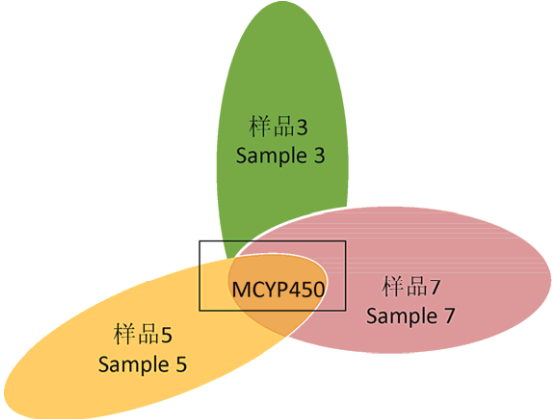


图 7 各样品中表达差异基因 KEGG 的韦恩图分析
Fig. 7 Venn analysis of KEGG of differentially expressed genes of samples.

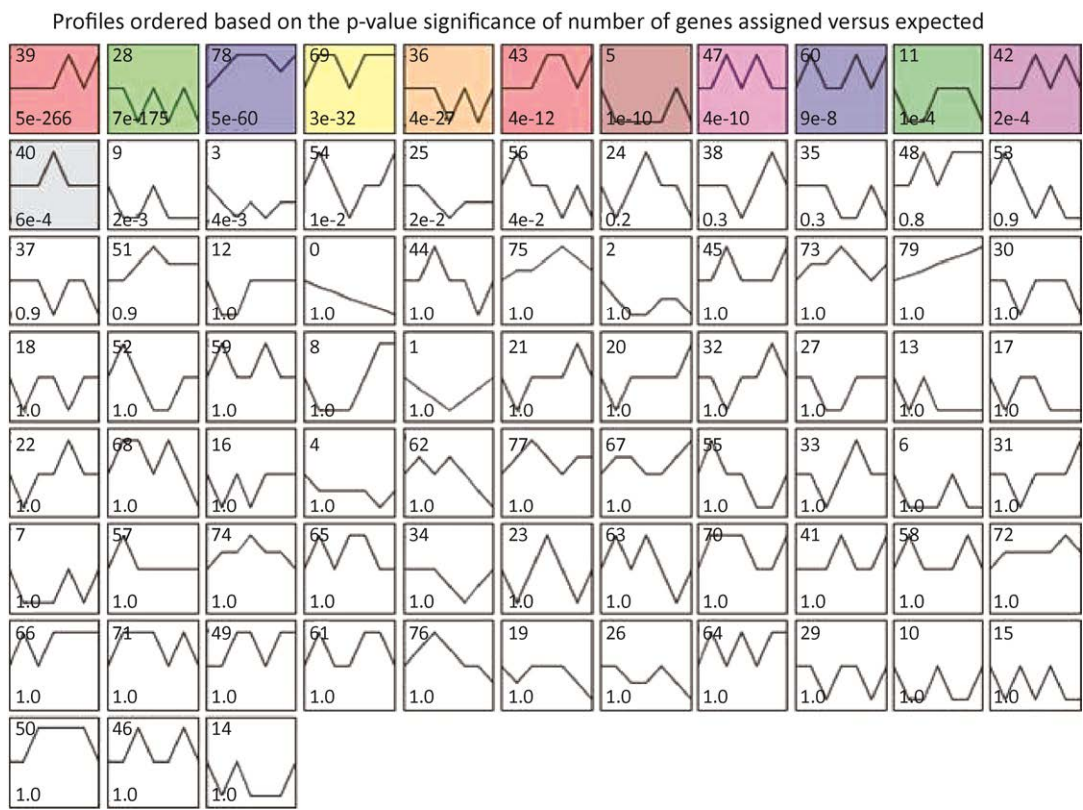


图 8 基因表达趋势分析 图中每一个矩形表示一种基因表达趋势，矩形中的横坐标表示时间相，纵坐标表示表达变化幅度 $\text{Log}_2[V(i)/V(0)]$ ， $V(i)$ 表示某时间点的表达值， $V(0)$ 表示 0 点的表达值. 矩形中左上角数字表示趋势模型（profile）的编号，左下角数字表示该趋势模型的 P 值
Fig. 8 Analysis of gene expression trends. Each rectangle in the graph represents a gene expression profile, the abscissa in the rectangle represents the time phase, and the ordinate represents the change range of expression $\text{Log}_2[V(i)/V(0)]$, $V(i)$ is the expression value of a time point, $V(0)$ is the expression value of starting point. The number in the upper left corner of the rectangle represents the number of the profile model, and the number in the lower left corner represents the P value of the profile model.

的趋势模型。图 7 中有色底框代表显著的趋势模型 ($P<0.05$), 无色底框代表不显著的趋势模型, 相同颜色代表相似性的表达趋势。趋势模型 profile 28 和 profile 39 是 80 个表达趋势中最显著的两个模型。在低温胁迫 20min 之内两个模型中的富集基因都没有发生变化, profile 28 中的富集基因低温胁迫 20min 后开始下调, profile 39 中的富集基因在低温胁迫 40min 后开始上调。趋势模型 profile 28 和 profile 39 中富集到的 34 个基因

进行基因共表达网络分析。

基因共表达网络中矩形代表基因, 直线代表基因之间的调控关系。矩形的颜色就是按照 k-core 进行划分的聚类结果。k-core 值表示该基因在整个网络中的重要程度, k-core 值越大表示基因在网络的位置越中心。相同大小的 k-core 体现的是基因之间的相似性及功能相关性。基因共表达网络中 VVO_04066 的 k-core 值最高 (k-core=7.0), 处于网络的核心地位 (图 9)。VVO_04066 编

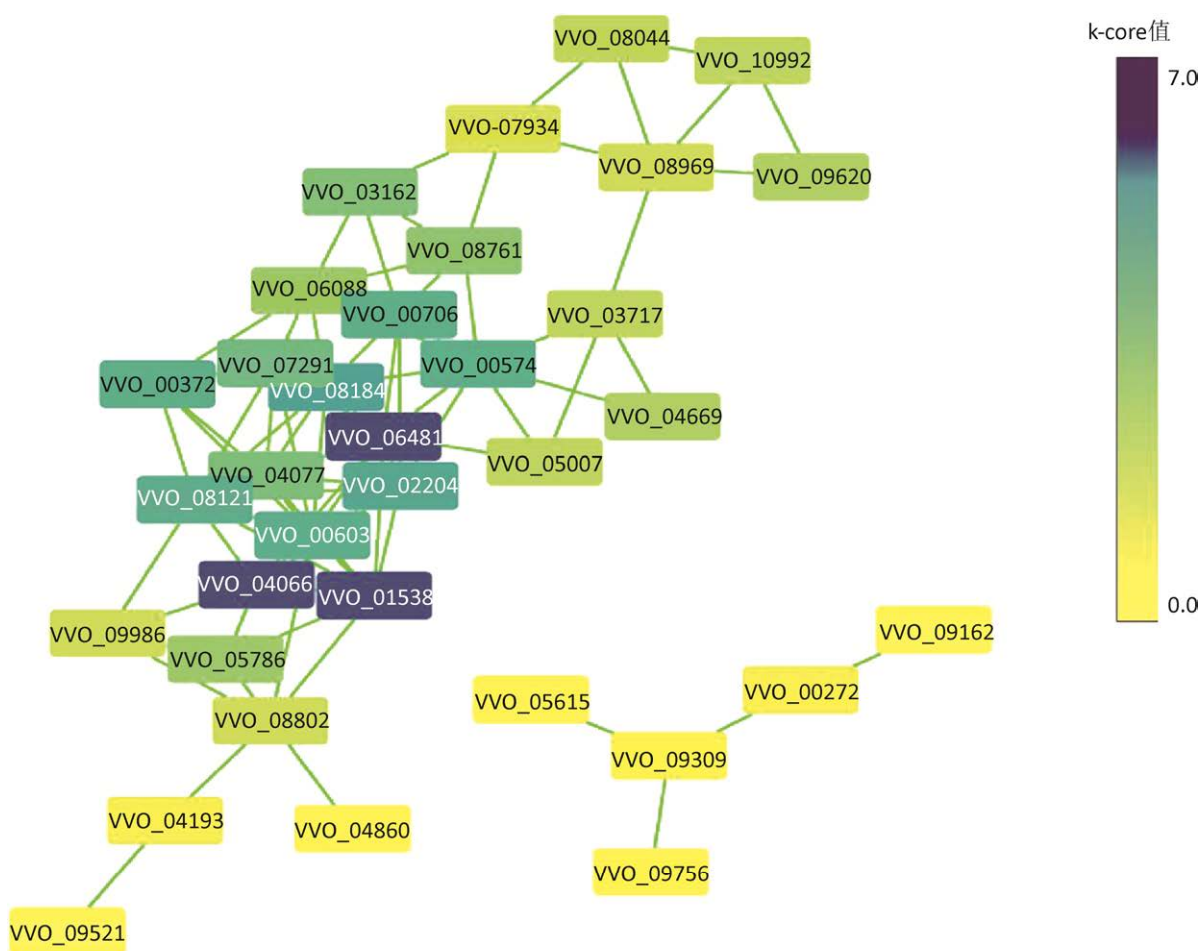


图 9 基因共表达网络分析 图中矩形代表一个基因, 直线代表基因之间的相互关系. 矩形的颜色由 k-core 值决定, 值越大颜色越趋向于深紫色, 值越小颜色趋向于亮黄色. k-core 值越大表示基因在网络的位置越重要

Fig. 9 Gene co-expression network. Each rectangle represents a gene, and a straight line represents the relationship between genes. The color of the rectangle is determined by the k-core value. The larger the value, the deeper the color tends to be, and the smaller the value, the color tends to bright yellow. The larger the k-core value, the more important the gene position in the network.

码磷酸肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC), 其水解产物为两个第二信使 1,4,5-三磷酸肌醇 (IP₃) 和 1,2-二酰甘油 (DAG)。1,4,5-三磷酸肌醇能够调节 Ca²⁺浓度及 Ca²⁺依赖的酶类或 Ca²⁺依赖的通道; 而脂溶性的 1,2-二酰甘油可以通过激活蛋白激酶 C 来调节一系列酶的活性 (Arisz *et al.* 2009)。磷酸肌醇特异性磷脂酶 C 具有调控细胞的免疫调节和胁迫应答的功能。基因共表达网络分析中 VVO_06481 和 VVO_00603 是与 VVO_04066 共表达系数最高的两个基因, 分别编码糖蛋白和几丁质合成酶, 糖蛋白是细胞信号的重要递质, 在细胞免疫调节和信号传导过程中具有重要作用, 几丁质合成酶在生物体低温和病虫害胁迫过程中发挥重要免疫功能。同时, 几丁质是真菌细胞壁的重要组成部分, 在低温胁迫时, 对于维持细胞结构和功能中具有重要作用 (巩凯玲等 2019)。由此推测草菇在低温胁迫初期可能通过调节 VVO_04066 的转录水平, 从而影响磷酸肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC) 的合成水平。PI-PLC 通过影响 Ca²⁺和激活蛋白激酶 C 浓度, 促进糖蛋白和几丁质的合成, 从而完成细胞的低温胁迫应答。

3 讨论

真菌漆酶具有降解木质素、抵御酚类物质的侵害和有助于子实体形成等多种生物学功能。本研究发现低温处理过程中, 漆酶 Laccase 1 的编码基因 VVO_04666 和 Laccase 2 的编码基因 VVO_04648 随着低温处理时间的延长, 表达量呈下降趋势, 其中 VVO_04648 在低温处理 80min 时, 转录水平最低 (fold change=0.8), 这与刘晓婷等 (2019) 开展低温处理蒙古口蘑的漆酶研究结果相似, 他们发现在 5℃ 处理蒙古口蘑时漆酶活性最低。

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 是生物体 (或离体培养的细胞) 在不良环境因子作用下产生的具有高度保守性的应激蛋白, 普遍存在于整个生物界。已有研究表明该蛋白在草菇的低温胁迫过程中发挥作用, 并且转录水平显著增加 (黄金丽等 2017; 赵妍等 2017)。而本研究中发现热休克蛋白编码基因 VVO_01324 在低温胁迫初期表达量变化很小 (Fold change=0.9–1.1), 推测是因为热休克蛋白是在低温胁迫中热激后转录水平增加, 进而在抵御低温胁迫中发挥重要作用。

KEGG 的分析结果发现细胞色素 P450 相关基因在低温处理草菇的过程中发生了很大的变化。细胞色素 P450 (CYP450) 广泛分布于各种生物体中, 其中包括动物、植物、真菌和细菌, 是有机体中的一类重要代谢酶系, 不仅对外界有害物质具有代谢作用, 还参与具有重要生理功能的内源性物质的合成, 比如: 脂肪酸、生物碱、生氰糖苷、萜类、黄酮类等次生代谢物质。脂肪酸是质膜的重要组成部分, 而质膜是细胞抵御低温侵害的生理屏障, 质膜中脂肪酸比例的增加对于低温条件下维持细胞稳定和结构完整性具有重要作用 (Pittman *et al.* 2014; 吕贝贝等 2015)。Liu *et al.* (2010) 和 Louesdon *et al.* (2014) 研究发现低温条件下除了可溶性糖对于维系细胞正常的渗透压作用显著, 生物碱也是重要的冷冻保护剂。目前作为冷冻保护剂研究最多的生物碱就是甜菜碱 (Koster *et al.* 1992; Kishitani *et al.* 1994; Parvanova *et al.* 2004; Louesdon *et al.* 2014) 低温胁迫条件下, 生物体通过诱导甜菜碱的积累, 维持细胞膜的稳定性和完整性, 提高细胞的渗透压调节能力, 从而增强细胞的抗冻性 (吕贝贝等 2015)。由此推测草菇低温胁迫过程中, 可能通过调节 VVO_06098 等基因表达水平, 提高细胞色素 P450 酶系活性, 进

而调控次生代谢物质如生物碱等的胞内浓度最终抵御低温对细胞的危害。

蛋白酶体 (proteasome) 在真核生物和原核生物中普遍存在。在真核生物中, 位于细胞核和细胞质中, 具有调控细胞凋亡的作用 (Koster & Lynch 1992)。细胞凋亡前, 泛素激活酶和泛素结合酶的数量增加, 由此推测蛋白酶体在细胞凋亡过程中发挥作用 (Kishitani *et al.* 1994)。

蛋白酶体信号通路基因的变化仅在样品 7 中出现, 由此可以推测在低温处理草菇的前 100min 内, 蛋白酶体相关基因还没有显著性表达, 直到 100–120min 的这个过程中, 蛋白酶体信号通路才发生显著变化, 影响蛋白质降解和细胞凋亡。

在低温胁迫过程中, 除细胞色素 P450、蛋白酶体外还有各种氨基酸的代谢、DNA 修复和硫代谢等多种代谢途径参与其中。氨基酸的代谢与蛋白质肽类的合成代谢密切相关, 核酸修复也是生物体应对外界刺激的重要反应。这些途径都与草菇的低温自溶具有一定关系, 但是这些途径是如何参与到草菇低温自溶过程中还需要进一步的实验验证。

[REFERENCES]

- Arisz SA, Testerink C, Munnik T, 2009. Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(9): 869-875
- Bao DP, Gong M, Zheng HJ, Zheng H, Chen M, Zhang L, Wang H, Jiang J, Wu L, Zhu Y, Zhu G, Zhou Y, Li C, Wang S, Zhao Y, Zhao G, Tan Q, 2013. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome. *PLoS One*, 8(3): e58294
- Chang ST, 1975. *Volvariella volvacea*. Hong Kong Chinese University Press, Hong Kong. 1-27
- Chang ST, 1993. Mushroom biology and mushroom products. The Chinese University Press, Hong Kong. 3-17
- Chen SC, Ma D, Ge W, 2003. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiology Letter*, 218: 143-148
- Gong KL, Chen SH, Ji XC, Lin YR, Zhang Q, 2019. Progress in the study of plant chitinase. *Molecular Plant Breeding*, 17(20): 6840-6849 (in Chinese)
- Huang JL, Zhao Y, Xin MM, Song XX, Chen MJ, 2017. Effect of heat shock on cold tolerance of *Volvariella volvacea* and induction of Hsp90 gene. *Shanghai Agricultural Journal*, 1: 15-20 (in Chinese)
- Jiang W, Zhao Y, Wang H, Feng AP, Chen MJ, 2014. Expression of glyc-3-phosphate acyltransferase gene in *Volvariella volvacea* during low temperature stress. *Mycosystema*, 33(2): 334-340 (in Chinese)
- Koster KL, Lynch DV, 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiology*, 98(1): 108-113
- Kishitani S, Watanabe K, Yasuda S, Arakawa K, Takabe T, 1994. Accumulation of glycine betaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant, Cell and Environment*, 17(1): 89-95
- Liu JF, Zhou RL, Zhao M, 2010. Progress in crops mechanism of freezing tolerance and antifreeze gene. *Ludong University Journal*, 26(3): 258-265
- Liu XT, Guo JF, Wang SF, Li YQ, Nari, Gao HK, Ma MY, 2019. Effect of low temperature on laccase activity and gene family expression of *Tricholoma mongolicum* mycelium. *China Agronomic Journal*, 35(3): 40-46 (in Chinese)
- Louesdon S, Charlot-Rougé S, Juillard V, Raphaëlle TM, Béal C, 2014. Osmotic stress affects the stability of freeze-dried *Lactobacillus buchneri* R1102 as a result of intracellular betaine accumulation and membrane characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1): 196-207
- Lv BB, Yu HL, Zhu ZP, Jiang W, He JH, Wu X, Li P, Wang

- JB, Wu GG, Tan Q, Tang XM, 2015. Transcriptome differences between cold tolerant mutant strain vtlt-1 and original strain V23 of *Volvariella volvacea*. *Mycosystema*, 34(6): 1143-1152
- Ng P, Wei CL, Sung WK, Chiu KP, Lipovich L, Ang CC, Gupta S, Shahab A, Ridwan A, Wong CH, Liu ET, Ruan Y, 2005. Gene identification signature (GIS) analysis for transcriptome characterization and genome annotation. *Nature Methods*, 2(2): 105-111
- Parvanova D, Popova A, Zaharieva I, Lambrev P, Konstantinova T, Taneva S, Atanasov A, Goltsev V, Djilianov D, 2004. Low temperature tolerance of tobacco plants transformed to accumulate proline, fructans, or glycine betaine. Variable chlorophyll fluorescence evidence. *Photosynthetica*, 42(2): 179-185
- Pittman JR, Buntyn JO, Posadas G, Nanduri B, Pendarvis K, Donaldson JR, 2014. Proteomic analysis of cross protection provided between cold and osmotic stress in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Proteome Research*, 13(4): 1896-1904
- Qiao N, Wang H, Chen MJ, 2009a. Expression of cold-induced gene *Cor1* in *Volvariella volvacea* during low temperature treatment. *Mycosystema*, 28(2): 213-219 (in Chinese)
- Qiao N, Wang H, Chen MJ, 2009b. Study on the expression of cold induced gene *Cor4* of *Volvariella volvacea* at low temperature. *Acta Agriculturae Shanghai*, 25(1): 14-17 (in Chinese)
- Song CQ, Miao HF, Zhu B, Tong SM, Li ZY, Hou HS, 2010. The role of plant glutathione-S-transferase in phytoremediation. *Anhui Agronomic Bulletin*, 7: 56-110 (in Chinese)
- Zhao Y, Yang HL, Huang JL, Chen MJ, Wang CG, Ren JF, Ma DD, 2017. Effect of heat shock on cold tolerance of *Volvariella volvacea* and induction of *Hsp100* gene. *Molecular Plant Breeding*, 8: 3036-3041 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 巩凯玲, 陈双慧, 纪晓晨, 林怡容, 张荃, 2019. 植物几丁质酶的研究进展. *分子植物育种*, 17(20): 6840-6849
- 黄金丽, 赵妍, 辛苗苗, 宋晓霞, 陈明杰, 2017. 热激处理对草菇耐冷性的影响及对 *hsp90* 基因的诱导. *上海农业学报*, 1: 15-20
- 姜威, 赵妍, 汪虹, 冯爱萍, 陈明杰, 2014. 低温胁迫下草菇甘油-3-磷酸酰基转移酶基因表达变化的研究. *菌物学报*, 33(2): 334-340
- 刘晓婷, 郭九峰, 王淑妍, 李亚娇, 那日, 高海荣, 马梦宇, 2019. 低温对蒙古口蘑菌丝体漆酶活性及其基因家族表达的影响. *中国农学报*, 35(3): 40-46
- 吕贝贝, 于海龙, 祝子坪, 蒋玮, 何建华, 吴潇, 李鹏, 王金斌, 武国干, 谭琦, 唐雪明, 2015. 草菇耐低温突变菌株 *Vtlt-1* 和原始菌株 V23 转录组差异的研究. *菌物学报*, 34(6): 1143-1152
- 乔娜, 汪虹, 陈明杰, 2009a. 草菇冷诱导基因 *Cor1* 在低温下表达变化的研究. *菌物学报*, 28(2): 213-219
- 乔娜, 汪虹, 陈明杰, 2009b. 草菇冷诱导基因 *Cor4* 在低温下表达变化的研究. *上海农业学报*, 25(1): 14-17
- 宋长芹, 缪海飞, 朱斌, 佟少明, 李泽昀, 侯和胜, 2010. 植物谷胱甘肽-S-转移酶在植物修复中的作用. *安徽农学通报*, 7: 56-110
- 赵妍, 杨焕玲, 黄金丽, 陈明杰, 王晨光, 任昀霏, 马丹丹, 2017. 热激处理对草菇耐冷性的影响及对 *hsp100* 基因的诱导. *分子植物育种*, 8: 3036-3041

(本文责编: 王敏)