

蜜环菌菌索分化的差异蛋白质组学研究

李兵 刘柳 郭顺星[◎]

中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所 北京 100193

摘要: 菌索是蜜环菌与宿主互作的组织结构, 蜜环菌菌丝形成菌索的分子机制尚不清楚。本研究采用 SWATH-MS^{ALL} 非标记定量蛋白质组学技术, 首次对 *Armillaria mellea* 菌丝形成菌索过程的蛋白质组学进行了系统研究。在蜜环菌菌丝和菌索中共鉴定蛋白 1 724 个 (global FDR 1%), 定量蛋白 1 179 个。与菌丝相比, 蜜环菌菌索差异表达蛋白 640 个 (上调表达 256 个, 下调表达 384 个)。差异表达蛋白 GO 注释结果表明, 蜜环菌菌索分化的生物学过程较复杂, 差异蛋白参与的主要生物学过程包括有机含氮化合物代谢、有机物生物合成、小分子代谢、氧化还原反应等。分子功能富集结果提示, 电子转运活性的富集因子最高, 而氧化还原反应的富集 *P* 值最显著, 这与 KEGG 注释的氧化磷酸化代谢活跃的结果一致。进一步的推测分析表明, 蜜环菌菌丝形成菌索可能是受到氧化应激所致, 菌索的形成可能促使诸如硫氧还蛋白样等毒力蛋白和富马酸的合成和释放增多, 抑制宿主免疫而有利于蜜环菌侵染和定植于宿主。因此, 对差异蛋白质组的进一步研究和深入解析不仅有利于揭示蜜环菌菌索形成的蛋白分子机制, 同时也具有较强的理论和现实意义。

关键词: 蜜环菌, 蛋白质组学, SWATH 非标记定量, 氧化应激, 富马酸, 硫氧还蛋白样蛋白

[引用本文] 李兵, 刘柳, 郭顺星, 2021. 蜜环菌菌索分化的差异蛋白质组学研究. 菌物学报, 40(6): 1357-1368

Li B, Liu L, Guo SX, 2021. Differential proteome of *Armillaria mellea* in association with fungal rhizomorph differentiation. Mycosystema, 40(6): 1357-1368

Differential proteome of *Armillaria mellea* in association with fungal rhizomorph differentiation

LI Bing LIU Liu GUO Shun-Xing[◎]

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: The mechanism of rhizomorph differentiation from the mycelia of *Armillaria* spp. is still unclear. The rhizomorph is the essential tissue in the interaction between *Armillaria* spp. and

基金项目: 国家自然科学基金(81773843, 81803666)和中国医学科学院医学与健康科技创新工程(CIFMS, 2017-I2M-3-013) Supported by the National Natural Science Foundation of China (81773843, 81803666) and Chinese Academy of Medical Science Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS, 2017-I2M-3-013).

◎ Corresponding author. E-mail: sxguo1986@163.com

Orcid: LI Bing (0000-0001-6667-6976), GUO Shun-Xing (0000-0003-0242-9591)

Received: 2021-01-14, accepted: 2021-03-04

hosts. In this study, SWATH MS^{ALL} label-free quantitative proteomics was applied to uncover the mechanism of rhizomorph formation. In total, 1 724 proteins (global FDR 1%) were identified from *Armillaria mellea* hypha (AH) and rhizomorphs (AR) based on data dependent acquisition (DDA) model and 1 179 proteins were quantified based on SWATH (sequential window acquisition of all theoretical fragment ions) label-free model. Compared with AH, 640 proteins differentially expressed at AR, of which 256 were up-regulated and 384 down-expressed. GO analytic results indicated that the differentiation of rhizomorph from hypha was complex, and the main biological processes (BP) involved in differentially expressed proteins (DEPs) included the metabolisms of organonitrogen compound, organic substance biosynthetic process, metabolic process, oxidation-reduction process, small molecule metabolic process etc. The results of molecular function (MF) enrichment suggested that the enrichment factor of electron transport activity was the highest, and the enrichment *P* value of oxidation-reduction reaction was the most significant, being consistent with the fact of activated oxidative phosphorylation metabolism annotated by KEGG. Further analysis showed that the differentiation of *A. mellea* rhizomorph may be induced by oxidative stress, and this promoted the synthesis and release of fumaric acid and virulence proteins such as thioredoxin-like protein to inhibit the immunologic system of hosts, resulting in the easier infection and colonization by *Armillaria* spp.

Key words: *Armillaria mellea*, proteomics, SWATH label-free quantification, oxidative stress, fumaric acid, thioredoxin-like protein

蜜环菌 *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. 是伞菌目、蜜环菌属的一类真菌。在蜜环菌生活史中，菌索是常见且极其重要的组织结构，几乎所有的蜜环菌均可以形成菌索。在实验室培育或自然条件下，蜜环菌的菌索间组成一个或小或大的菌索网络，逐步向外围空间延伸，这使得蜜环菌成为地球上最大的陆地生物 (Smith *et al.* 1992; Anderson & Catona 2014)。蜜环菌形成的菌索具有侵染宿主、抵御逆境、竞争其他微生物、吸收和传递营养物质、运输氧气等生物学功能 (Baumgartner *et al.* 2011)，这巩固了菌索作为探索性和吸收性器官的作用，适合于桥接营养源与潜在寄主之间的鸿沟。天麻和猪苓是我国传统的中药，其基源物种均可以与蜜环菌建立共生关系，蜜环菌以菌索的形式侵

染二者，并为它们提供营养物质 (郭顺星和徐锦堂 1990, 1992)，蜜环菌菌索也成为影响天麻和猪苓产量的关键要素，更是评价蜜环菌菌种优劣的标准。尽管如此，蜜环菌菌丝形成菌索的相关研究较少，形成机制尚不清楚，亟待探索研究。

基于数据依赖性采集 (data dependent acquisition, DDA) 模式的定性蛋白质组和数据非依赖性采集 (data independent acquisition, DIA) 模式的 SWATH 定量蛋白质组学技术为挖掘差异表达蛋白提供了一种新的选择，该方法具有高效、成本相对较低、高通量、准确度高等优点，已广泛应用于动物、植物、微生物等领域，在揭示生命活动规律等方面发挥了重要作用 (Collins *et al.* 2016; Li *et al.* 2017)。

为探索蜜环菌菌索分化的蛋白分子机制,本研究首次对 *Armillaria mellea* 的菌丝与菌索进行了系统的蛋白质组学研究,获得了菌丝分化形成菌索的差异蛋白质组和生物信息学分析结果,为进一步研究蜜环菌提供了参考性研究方向。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本研究所用菌株是本课题组从猪苓菌核中分离、培养和纯化的蜜环菌菌株,命名为 *A. mellea* 541 (刘蒙蒙等 2015);菌种液氮冻存,备用。

1.2 蜜环菌培养

马铃薯琼脂糖培养基 (potato dextrose agar, PDA) 平皿培养 *A. mellea* 541。其固体基质菌种接种于 PDA 平皿中,室温避光培养。接种后的第 21 天收集同一皿中的蜜环菌菌丝 (*A. mellea* hypha, AH) 和菌索 (*A. mellea* rhizomorphs, AR), 作为对照组和实验组。样品称重,液氮速冻后超低温保存,备用。

1.3 *A. mellea* 541 菌丝形成菌索的差异蛋白质组学

A. mellea 541 菌丝分化形成菌索过程的差异蛋白质组方法的主要步骤包括:生物样品 (菌丝和菌索) 总蛋白的提取、纯化,蛋白的还原乙酰化,特异性位点的限制性酶切反应制备肽段溶液,菌丝和菌索蛋白的 nano LC-Triple TOF MS/MS 定性方法建立及定性数据采集,菌丝和菌索的蛋白 SWATH 定量方法建立及 SWATH 定量数据采集等,参考 Huang *et al.* (2009)、Li *et al.* (2017)、李兵等 (2017) 和宋晓晶 (2020) 的方法,本研究也对一些参数进行了优化:优化了多肽的 nano LC 洗脱方法,即 B 相初始占比 5% (A 相 95%) 在

1min 内迅速升高至 13%,再经 69min 缓慢升高 B 相至 50%以洗脱色谱柱上的大部分肽段,后经 5min 过度 B 相至 80%并等度冲洗小极性肽段 5min,再经 1min 将 B 相调至初始占比 5%,平衡色谱柱 9min [其中:A 相为甲酸-乙腈-水 (0.1:2:98, V/V/V), B 相为甲酸-乙腈-水 (0.1:98:2, V/V/V)];高分辨模式下,母离子在线分级范围优化为 300–555m/z 和 550–1 250m/z, Triple TOF MS 的 IHF 设置为 150, ISDF 设置为 2 500; SWATH 定量动态采集窗口及范围包括 300–323.5、322.5–352.5、351.5–367.5m/z 等 60 个定量采集窗口。

1.4 数据处理及生物信息学分析

1.4.1 构建 *A. mellea* 541 理论蛋白库:将 *A. mellea* 541 菌索和菌丝转录组的 unigene 序列翻译为蛋白 fasta 序列,以 *A. gallica* 为参比物种进行 blast 并用 uniprot 进行在线注释,获得以 uniprot ID 和 Novel 组成的 *A. mellea* 541 理论蛋白库。ProteinPilot v5.0 软件 (AB Sciex) 对以 DDA 模式收集的数据进行蛋白鉴定,搜索结果形成已鉴定蛋白质文库。

1.4.2 确定 *A. mellea* 541 菌丝和菌索定量蛋白:使用 PeakView™ v.1.0 (AB Sciex) 处理 AH 和 AR SWATH 数据。SWATH 定量数据经保留时间校正、离子碎片信息提取和定量等处理,获得离子、肽段和蛋白的定量信息 (李兵等 2017; 宋晓晶 2020)。

1.4.3 软件分析:利用 Omicsbean™ 在线分析软件,对 AH 和 AR 定量数据进行质控分析,经面积归一化处理,获得 *A. mellea* 541 菌所分化的差异蛋白质组 ($P \leq 0.05$ 和 AR/AH Fold change (FC) ≥ 1.5 或 ≤ 0.067)。差异蛋白进行 Gene Ontology (GO) 功能注释和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 通路分析 (Ashburner *et al.* 2000; Kanehisa *et al.* 2016)。

2 结果与分析

2.1 蜜环菌菌丝分化形成菌索过程的蛋白质组

A. mellea 541 菌丝形成菌索过程中, AH 和 AR 总蛋白经前处理、特异性限制性酶切反应制备肽段溶液, 再经除盐、富集和毛细管色谱柱洗脱后, 采集的 AH 和 AR 的 DDA 数据经 ProteinPilot 分析, 获得 global FDR 1% 范围内的二级谱图共 100 185 个 (global FDR 1% from Fit 为 81.5%), 匹配肽段 11 627 个 (global FDR 1% from Fit 为 94.7%)。本研究从 *A. mellea* 541 菌丝和菌索中共鉴定蛋白 1 724 个 (global FDR 1%) (global FDR 1% from Fit 为 83.4%), 其中已知蛋白 1 721 个 (如 A0A2H3DHR7、A0A2H3CTI3 和 A0A2H3EB94 等), 未知蛋白 3 个 (包括 Novel00443、Novel00043 和 Novel01184)。

2.2 蜜环菌菌丝形成菌索的差异蛋白质组

本研究采用非标记定量方式对 *A. mellea* 541 菌丝形成菌索过程中的表达蛋白进行定量, 收集菌丝和菌核样品, 每组中有 3 个生物学重复样品, 每个样品收集 3 次 SWATH, 总共有 18 个 SWATH 数据。最终有效定量蛋白 1 179 个, 其中已知蛋白定量 1 177 个, 未知蛋白定量 2 个 (Novel00443 和 Novel00043)。

AR 组和 AH 组蛋白峰面积经归一化处理 (图 1A) 后, AR 组及 AH 组的生物学重复样品均聚类良好, 分属两个不同的类群 (图 1B, 1C)。经 T-test 检验, AR 组和 AH 组间获得 640 个差异表达蛋白 ($P \leq 0.05$ 和 AR/AH Fold change (FC) ≥ 1.5 或 ≤ 0.067), 其中上调表达 256 个, 下调表达 384 个 (图 1D)。

2.3 差异表达蛋白 GO 注释

A. mellea 541 菌丝形成菌索过程差异表达蛋白 GO 富集见图 2。蜜环菌菌丝形成菌索中的差异表达蛋白细胞定位, 即细胞组成

(cell component) 呈多样性分布, 主要分布在细胞质和胞内细胞器。蛋白复合体是一些差异表达蛋白的广泛分布形式, 包括胞内核糖体蛋白复合体、蛋白体复合体、线粒体复合体、膜蛋白复合体、ATP 合酶复合体及三羧酸循环复合体等, 这表明这些差异蛋白可能参与复合体组装, 还参与诸如 ATP 合成、氧化还原、核糖体代谢等生物过程。

A. mellea 541 菌丝形成菌索差异表达蛋白参与的生物学过程 (biological process, BP) 注释及富集分析见图 2A。这些差异蛋白中, 参与小分子代谢过程的差异蛋白占比 20%, 24% 的差异表达蛋白与单细胞和代谢过程相关, 有机含氮化合物代谢和生物合成过程的差异表达蛋白总占比 17%。此外, 菌丝形成菌索差异表达蛋白还参与碳水化合物代谢、蛋白定位和折叠、胞内大分子复合体聚集、内吞等生物学过程 (图 2A)。结果表明, 菌丝分化形成菌索过程是一个复杂的生物学过程, 可能涉及大分子组装、小分子代谢、蛋白表达、物质转运、氧化应激等诸多生物学途径。在差异表达蛋白中, 有 8 个差异表达蛋白参与应答氧化应激反应, 以血红素过氧化酶 (heme peroxidase, A0A2H3CW41)、过氧化氢酶 (catalase, A0A2H3DX77)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, A0A2H3CTQ2)、OsmC 样蛋白 (OsmC-like protein, A0A2H3DNT3) 等蛋白为代表, 这些蛋白均参与氧化还原反应过程, 发挥消除体内多余的活性氧物质的功能, 以维持机体内活性氧物质的代谢平衡 (Staerck *et al.* 2017)。与菌丝相比, 这些蛋白在 *A. mellea* 541 菌索中上调表达 (AR/AH 依次为 6.22、1.70、1.68 和 4.02), 表明菌丝分化形成菌索时活性氧物质在菌索中累积, 机体可能处于氧化应激状态, 这反馈性地调节并激活了抗氧化反应机制。

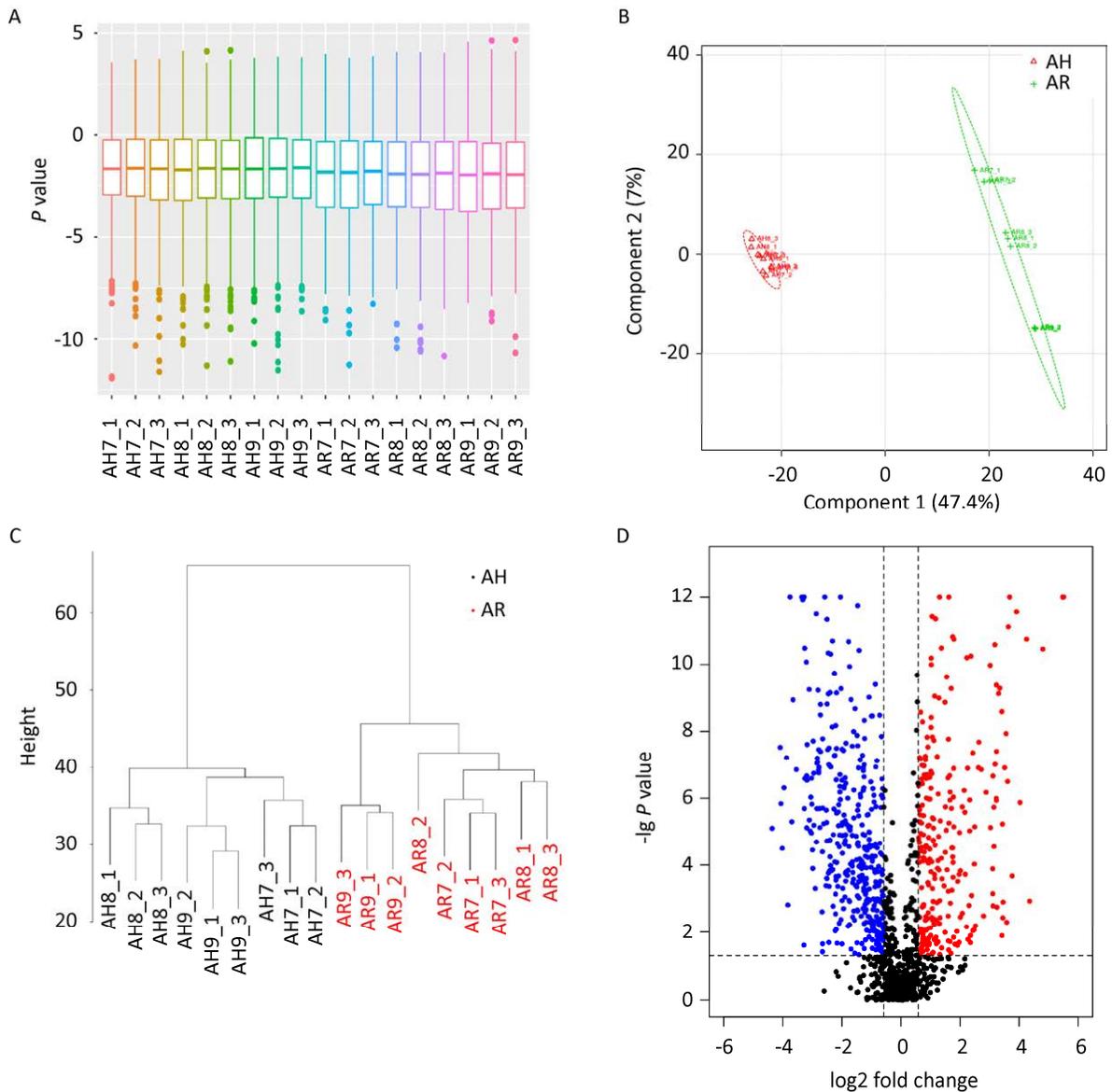


图 1 蜜环菌菌丝形成菌索蛋白质组定量质控及差异蛋白分析 A: 定量蛋白峰面积归一化结果; 主成分分析 (B) 和聚类分析 (C): 蜜环菌菌索与菌丝聚类为两个不同的类群; D: 蜜环菌菌索与菌丝间差异表达蛋白分布结果 (红色为上调蛋白, 蓝色为下调蛋白)

Fig. 1 Quantitative control of SWATH label-free quantitative proteome of *Armillaria mellea* rhizomorphs differentiated from hypha and volcano plot of differentially expressed proteins (DEPs) between rhizomorph and hypha. A: Total quantified protein areas after normalized; B and C: Indicated rhizomorph and hypha were classed into different group by PCA and clustering analysis; D: Volcano plot of DEPs between rhizomorph group and hypha group (red blots, up-regulated proteins; blue blots, down-regulated proteins).

分子功能 (molecular function, MF) 注释和富集分析结果也表明了蜜环菌菌丝形成菌索过程激活了氧化应激反应, 以氧化还原反应富集 *P* 值最高 (图 2B), 其中超氧化物

歧化酶、过氧化氢酶、血红素过氧化酶、OsmC 样蛋白等富集在抗氧化活性 (antioxidant activity) 通路, 这再次表明了氧化应激可能在菌丝形成菌索中发挥着作用。此外, 在此

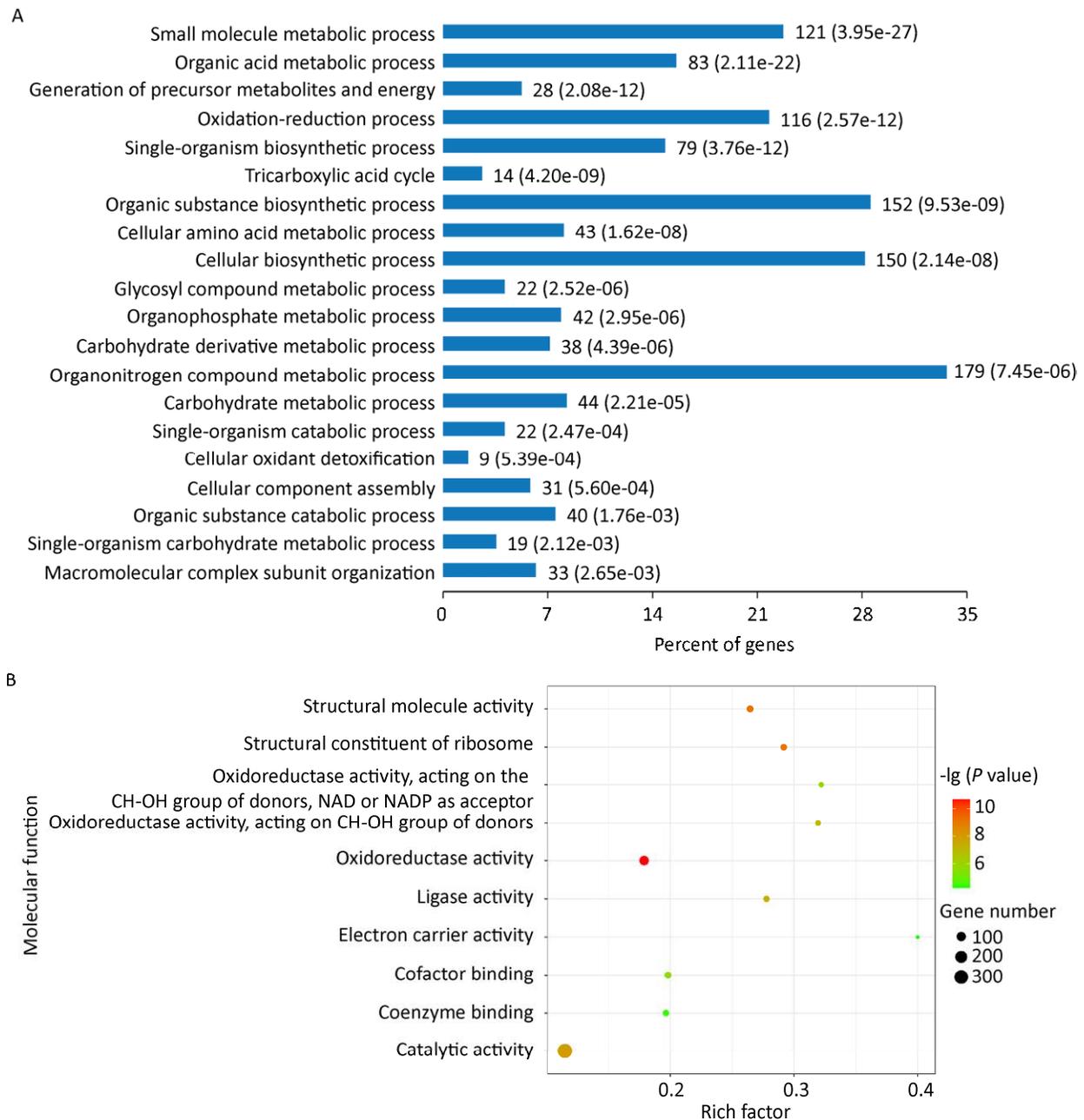


图 2 蜜环菌菌丝形成菌索差异表达蛋白的 GO 注释富集结果 A: 蜜环菌菌丝形成菌索差异表达蛋白的生物学过程分析和富集结果; B: 蜜环菌菌丝形成菌索差异表达蛋白的分子功能分析和富集结果

Fig. 2 The GO analysis and enrichment results of DEPs of *Armillaria mellea* rhizomorphs differentiated from hypha. A: Biological process analysis results of DEPs; B: Molecular function analysis results of DEPs.

通路中, 还有 3 个硫氧还蛋白样蛋白 (thioredoxin-like protein, Trx), 依次为 A0A2H3EBV3、A0A2H3DRE2 和 A0A2H3E146。Trx 具有清除活性氧物质发挥抗氧化作用, 还是毒力蛋白, 可抑制宿主免疫 (Farshchi *et al.*

2012; Yang *et al.* 2019)。与菌丝相比, A0A2H3E146 在蜜环菌菌索中上调表达 (AR/AH 2.22), 而其余两种 Trx 下调表达 (AR/AH 依次为 0.15 和 0.55), 表明这 3 种 Trx 可能分属两种类型, 发挥氧化或毒力因子的生物学功

能。*A. mellea* 541 菌丝形成菌索过程差异表达蛋白分子功能的其余富集结果见图 2B，主要包括催化活性、结构分子活性、连接酶活性、电子转运、辅酶结合活性等，其中发挥催化反应活性的差异表达蛋白数量最多，电子转运活性的富集因子最高。

2.4 差异表达蛋白 KEGG 通路分析

A. mellea 541 菌丝形成菌索过程中差异表达蛋白的 KEGG 通路注释及富集分析结果表明，大部分差异蛋白参与代谢过程，包括碳水化合物代谢、能量代谢、脂质代谢和氨基酸代谢等（图 3）。氧化磷酸化是能量

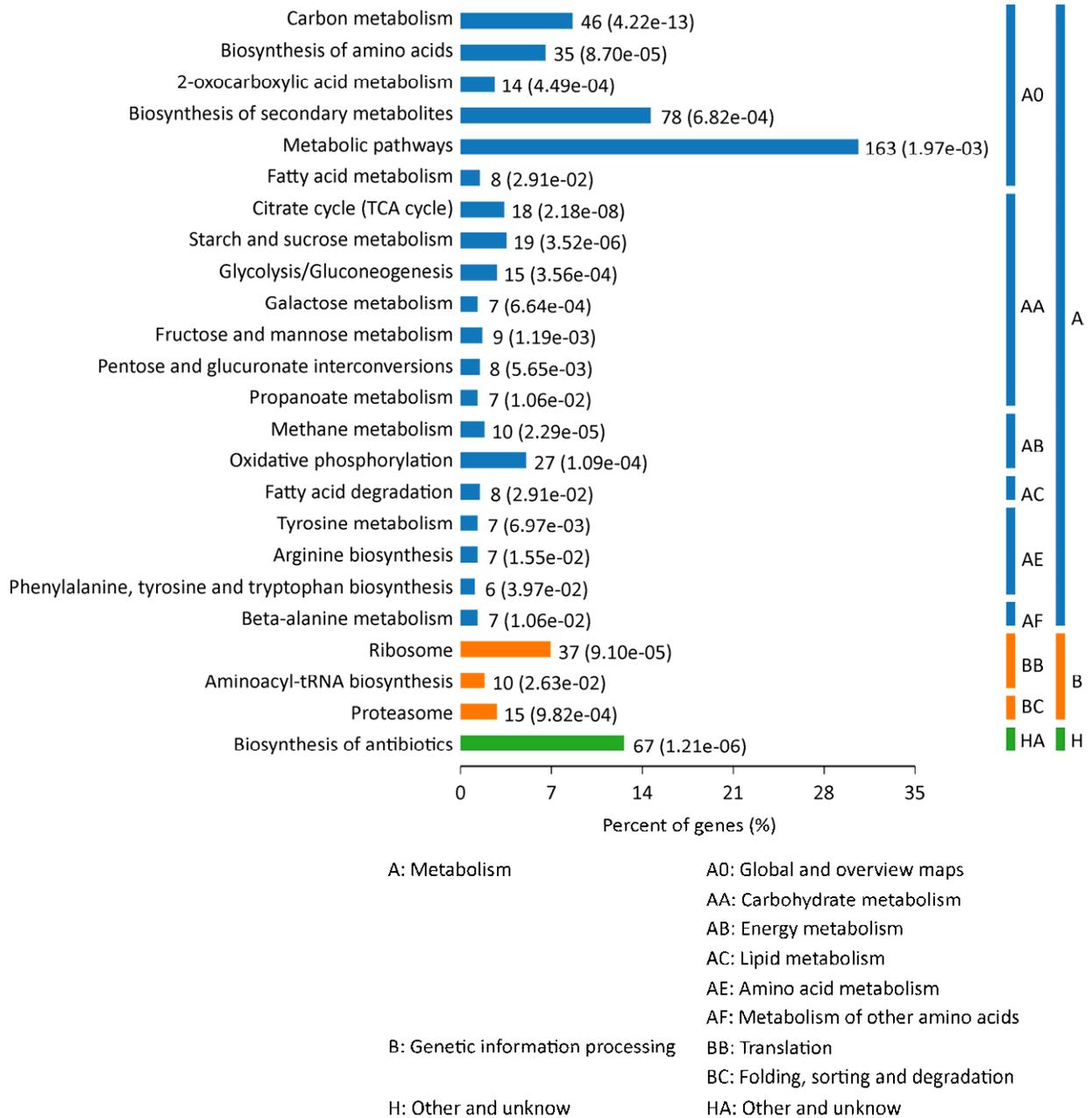


图 3 蜜环菌菌丝形成菌索差异表达蛋白的 KEGG 注释富集结果

Fig. 3 The KEGG pathway analysis and enrichment results of DEPs of *Armillaria mellea* rhizomorphs differentiated from hypha.

代谢的主要形式, 有 27 个差异蛋白参与该过程。电子转移链复合体 2 组成蛋白琥珀酸脱氢酶铁硫亚基 (succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit, A0A2H3E088)、复合体 3 组成蛋白 LuxS/MPP 样金属水解酶 (LuxS/MPP-like metallohydrolase, A0A2H3DDW6)、复合体 4 组成蛋白细胞色素 c 氧化酶亚基 IV (cytochrome c oxidase subunit IV, A0A2H3E1P1) 和 ATP 合成酶亚基 e (ATP synthase subunit e, A0A2H3E203) 为代表的蛋白在蜜环菌菌索中上调表达, AR/AH 比值依次为 5.10、2.58、2.06 和 3.16, 表明菌索 ATP 供能增加, 能量代谢活跃 (Nolfi-Donagan *et al.* 2020)。参与物质代谢的差异表达蛋白数量较多, 其中碳代谢富集最为显著 (46 个), 19 个蛋白与淀粉和蔗糖代谢相关、参与三羧酸循环代谢差异蛋白 18 个和参与糖酵解/糖异生过程的差异蛋白 15 个 (图 3 的 AA 部分)。A. mellea 541 菌索形成过程中, 8 个差异表达蛋白参与脂肪酸代谢, 7 个差异表达蛋白参与酪氨酸、精氨酸、丙氨酸等的代谢 (图 3 的 BB 部分)。A. mellea 541 菌索形成菌索过程中, 差异表达蛋白发挥的另一类功能为基因信号处理, 包括核糖体代谢 (37 个)、氨基酰基 tRNA 生物合成 (10 个) 和蛋白体代谢 (15 个) (图 3 的 BC 部分)。

2.5 差异表达蛋白相互作用分析

蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析结果见图 4。在绘制的 PPI 网络图中, 4 个蛋白与碳代谢相关, 为 A0A2H3D6C1 (富马酸还原酶, fumarate reductase)、A0A2H3E8S2 (柠檬酸合酶, citrate synthase)、A0A2H3E3Z7 (线粒体琥珀酸-CoA 连接酶[ADP 生成] β 亚基, succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta) 和 A0A2H3EAW0 (柠檬酸合酶, citrate synthase)。富马酸还

原酶和线粒体琥珀酸-CoA 连接酶[ADP 生成] β 亚基与 A0A2H3E088 (琥珀酸脱氢酶[泛醌]铁-硫亚基, succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit) 共同参与富马酸-琥珀酸-琥珀酰辅酶 A 途径的代谢, 与菌丝相比, 富马酸还原酶和线粒体琥珀酸-CoA 连接酶[ADP 生成] β 亚基在菌索中下调表达 (AR/AH 依次为 0.48 和 0.66) 而琥珀酸脱氢酶[泛醌]铁-硫亚基上调表达 (AR/AH 5.11), 表明富马酸合成累积增多。此外, 琥珀酸脱氢酶[泛醌]铁-硫亚基 (A0A2H3E088) 也是蜜环菌电子呼吸链复合体 II 的亚基, 在菌索中上调表达, 表明菌索 ATP 合成增加。A0A2H3E8S2 是柠檬酸代谢生成乙酰辅酶 A 的关键酶, 在菌索中显著上调表达 (AR/AH 5.59), 表明代谢朝着乙酰辅酶 A 累积的方向进行。

A. mellea 541 菌丝形成菌索过程中, 碳代谢与氧化磷酸化、三羧酸循环、氨基酸生物合成、抗生素生物合成、草酰乙酸代谢和核糖体等相关联, 其中以核糖体网络互作蛋白最多, 共 16 个。泛素-40S 核糖体蛋白 S31 融合蛋白 (A0A2H3E7L1) 是连接各代谢通路的枢纽蛋白, 是 40S 核糖体的重要组成单元。敲除编码基因, 则影响细胞生长 (Fernández-Pevida *et al.* 2016); 若该蛋白发生甲基化修饰, 也可以调控盘基网柄菌细胞发育 (Mangiarotti & Giorda 2002)。与 A. mellea 541 菌丝相比, 泛素-40S 核糖体蛋白 S31 融合蛋白在菌索中上调表达 (AR/AH 1.92), 表明菌索的细胞生长速度可能会快于菌丝细胞的生长速度, 继而菌索生长速度会快于菌丝的生长速度; 无论在实验室培养还是蜜环菌伴栽猪苓或天麻的生产活动中, 蜜环菌菌索的生长速度显著快于菌丝的生长速度, 这表明该蛋白可能是调控蜜环菌细胞生长的一个关键蛋白。

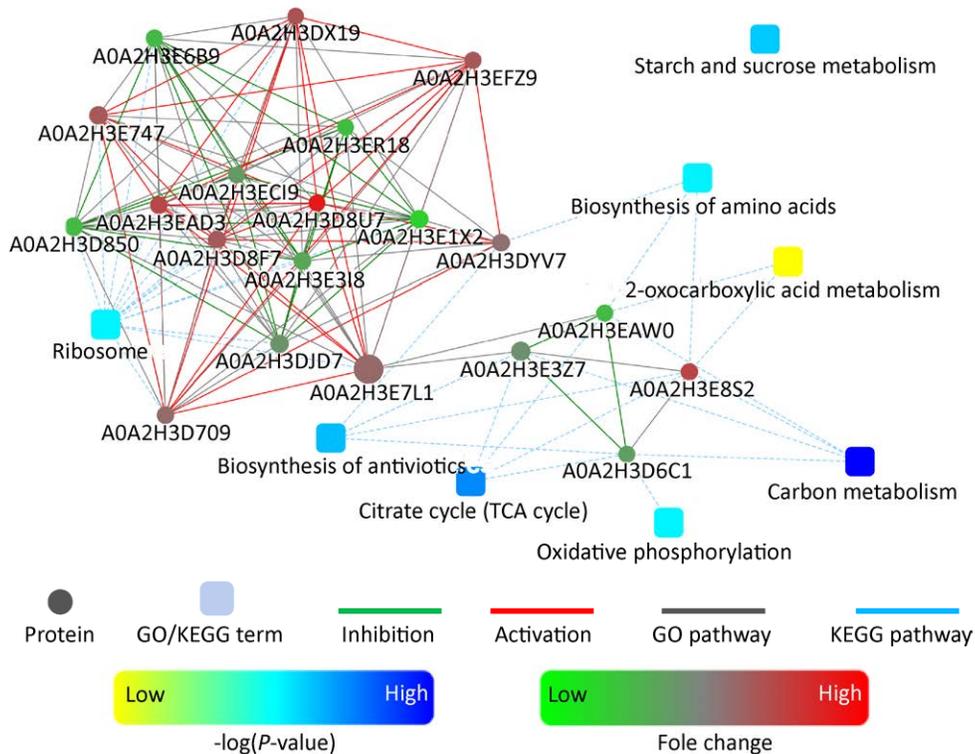


图 4 蜜环菌菌丝形成菌索差异表达蛋白间相互作用分析结果

Fig. 4 The protein-protein interaction analysis and enrichment results of DEPs of *Armillaria mellea* rhizomorphs differentiated from hypha.

3 讨论

蜜环菌菌索是菌丝的一种特化形式，也是侵染宿主的组织结构，菌索的多少直接影响天麻的产量（陈明义等 2004），但是蜜环菌菌丝分化形成菌索的机制目前尚不清楚。为探索蜜环菌菌索形成的机制，本研究引入先进的 SWATH 非标记定量蛋白质组学技术，测定了蜜环菌菌丝与菌索的蛋白质组；采用 SWATH 定量模式对蜜环菌菌丝和菌索中鉴定蛋白进行了非标记定量，并获得了菌丝分化形成菌索的差异表达蛋白质组。在此基础上，对差异表达蛋白质组进行了系统的 GO 注释、KEGG 代谢通路分析和蛋白-蛋白相互作用分析，揭示了蜜环菌菌丝分化形成菌索可能是由于氧化应激所致，菌索的形成使诸如富马酸和毒力蛋白合成和释放增多，有利于蜜环

菌侵染和定植于宿主。

通过对蜜环菌菌丝形成菌索差异蛋白质组的结果进行解析，表明菌索形成过程可能经历了氧化应激反应过程。活性氧是高反应性物质，如果大量累积，机体形成的氧化应激状态会对细胞成分（如核酸、脂质和蛋白质等）产生潜在的有害影响。为了将活性氧维持在无毒浓度，酶促细胞抗氧化剂可协调其生产与降解之间的平衡（Staerck *et al.* 2017）。超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、血红素过氧化酶、OsmC 样蛋白和硫氧还蛋白等代表了用于清除胞内/外过量活性氧物质的重要酶类抗氧化剂。在半营养型子囊菌中，血红素过氧化酶除具有抗氧化活性外，还可以与碳水化合物结构域功能性连接，可能对其植物致病性产生重大影响（Zámocký *et al.* 2017）。超氧化物歧化酶在宿主对真菌产生的

活性氧物质解毒过程中发挥着重要的作用。超氧化物歧化酶和过氧化氢酶可清除真菌体内的超氧负离子和过氧化氢, 或者抵御宿主产生的活性氧物质, 以维持机体活性氧物质平衡和发挥免疫原活性 (Shibuya *et al.* 2006; Chaves & da Silva 2012)。对于一些致病性真菌, 超氧化物歧化酶也被认为是一种细胞毒力因子 (Hwang *et al.* 2002), 如白色念珠菌。在大肠杆菌中, OsmC 样蛋白利用其高反应性半胱氨酸硫醇基团清除过氧化产物 (Lesniak *et al.* 2003)。硫氧还蛋白是抗氧化酶系中的另一类蛋白, 硫氧还蛋白样蛋白是与硫氧还蛋白具有高度保守结构域的蛋白, 敲除肺炎球菌中编码该蛋白的基因 (*Etrx1*), 肺炎球菌对活性氧物质的敏感性降低 (Farshchi Andisi *et al.* 2012)。*A. mellea* 541 菌丝形成菌索过程有 3 个硫氧还蛋白样蛋白差异表达, 其中硫氧还蛋白样蛋白 (A0A2H3E146) 在菌索中上调表达, 说明菌索对活性氧物质的敏感性增加, 抗氧化能力增强。另据 Yang *et al.* (2019) 报道, 爱德华氏菌 *Edwardsiella piscicida* 是一种鱼类寄生菌, 可以释放硫氧还蛋白样蛋白, 该蛋白可作为细胞毒力因子, 消除宿主的 ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) 的同源相互作用和磷酸化, 抑制下游胞外信号调节蛋白激酶——p38-丝裂原活化蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase 1/2-p38-mitogen-activated protein kinase, Erk1/2-p38-MAPK) 信号通路而抵御宿主免疫反应, 以达到侵染的目的。猪苓或天麻的生长发育离不开蜜环菌, 蜜环菌以菌索的组织形式侵染二者, 最终建立共生关系。这些蛋白在蜜环菌菌索中上调表达, 一方面说明氧化应激可能诱导菌丝分化继而形成菌索, 另一方面菌索释放毒力因子并可能通过 Erk1/2-p38-MAPK 信号通路途径抑制宿主免疫

反应而实现侵染的目的, 其具体机制有待深入研究。

在蜜环菌菌丝分化形成菌索的过程中, 与菌丝相比, 电子呼吸链复合体 (含 ATP 合成酶) 的一些亚基和富马酸代谢酶在蜜环菌菌索中上调表达, 这可能产生两种结果, 一方面 ATP 合成增加, 供能充足 (Ferne *et al.* 2004), 更有利于菌索的形成、分枝甚至去侵染宿主; 另一方面, 累积的有机酸 (富马酸) 或许可能释放到环境, 溶解矿物质, 增加菌索吸收和转运如磷等类物质的能力; 此外, 过多的释放富马酸到环境中, 也改变了宿主的生活条件, 累积的富马酸也可以抑制宿主的线粒体代谢 (Schliemann *et al.* 2008), 从而增加蜜环菌菌索侵染宿主的几率。蜜环菌是宿主 (如天麻、猪苓菌核) 的营养供给体, 为它们的生长发育提供充足的营养物质 (郭顺星和徐锦堂 1990, 1992), 有机酸的释放或许加快蜜环菌与宿主共生关系的建立, 而蜜环菌菌索的形成促进了这一进程。

[REFERENCES]

- Anderson JB, Catona S, 2014. Genomewide mutation dynamic within a long-lived individual of *Armillaria gallica*. *Mycologia*, 106: 642-648
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G, 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25: 25-29
- Baumgartner K, Coetzee MP, Hoffmeister D, 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Molecular Plant Pathology*, 12: 515-534
- Chaves GM, da Silva WP, 2012. Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct

- role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107: 998-1005
- Chen MY, Li FH, Bian YB, 2004. Effect of different strains of *Armillariella mellea* on the yield of *Gastrodia elata*. *Acta Edulis Fungi*, 11(1): 46-48 (in Chinese)
- Collins BC, Hunter CL, Liu YS, Schilling B, Rosenberger G, Bader SL, Chan DW, Gibson BW, Gingras AC, Held JM, Hirayama-Kurogi M, Hou GX, Krisp C, Larsen B, Lin L, Liu SQ, Molloy MP, Moritz RL, Ohtsuki S, Schlapbach R, Selevsek N, Thomas SN, Tzeng SC, Zhang H, Aebersold R, 2016. Multi-laboratory assessment of reproducibility, qualitative and quantitative performance of SWATH-mass spectrometry. *Nature Communications*, 8(1): 291
- Farshchi Andisi V, Hinojosa CA, de Jong A, Kuipers OP, Orihuela CJ, Bijlsma JJE, 2012. Pneumococcal gene complex involved in resistance to extracellular oxidative stress. *Infection and Immunity*, 80: 1037-1049
- Fernández-Pevida A, Martín-Villanueva S, Murat G, Lacombe T, Kressler D, de la Cruz J, 2016. The eukaryote-specific N-terminal extension of ribosomal protein S31 contributes to the assembly and function of 40S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Research*, 44(16): 7777-7791
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ, 2004. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 254-261
- Guo SX, Xu JT, 1990. Studies on the cell ultrastructure in the course of *Gastrodia elata* digesting *Mycena osmundicola* Lange and *Armillaria mellea* Fr. *Acta Mycologica Sinica*, 9(3): 218-225+249-251 (in Chinese)
- Guo SX, Xu JT, 1992. Nutrient source of sclerotia of *Grifola umbelata* and its relationship to *Armillaria mellea*. *Acta Botanica Sinica*, 34(8): 576-580+647-648 (in Chinese)
- Huang HZ, Nichols A, Liu DJ, 2009. Direct identification and quantification of aspartyl succinimide in an IgG2 mAb by RapiGest SF assisted digestion. *Analytical Chemistry*, 81(4): 1686-1692
- Hwang CS, Rhie G, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO, 2002. Copper-and-zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology*, 148: 3705-3713
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M, 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(1): 457-462
- Lesniak J, Barton WA, Nikolov DB, 2003. Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Science*, 12(12): 2838-2843
- Li B, Tian X, Wang CL, Zeng X, Xing YM, Ling H, Yin WQ, Tian LX, Meng ZX, Zhang JH, Guo SX, 2017. SWATH label-free proteomics analyses revealed the roles of oxidative stress and antioxidant defending system in sclerotia formation of *Polyporus umbellatus*. *Scientific Reports*, 7: 41283
- Li B, Wang CL, Xing YM, Zeng X, Tian LX, Guo SX, 2017. Differential proteome analysis of sclerotium formation stages of *Polyporus umbellatus*. *Mycosystema*, 36(1): 60-70 (in Chinese)
- Liu MM, Xing YM, Guo SX, 2015. Investigation of symbiotic *Armillaria* species with Chinese traditional medicinal fungus *Polyporus umbellatus*. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 50(5): 390-393 (in Chinese)
- Mangiarotti G, Giorda R, 2002. Synthesis of ribosomal proteins in developing *Dictyostelium discoideum* cells is controlled by the methylation of proteins S24 and S31. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(2): 261-270
- Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S, 2020. Mitochondrial electron transport chain:

- oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*, 37: 101674
- Schliemann W, Ammer C, Strack D, 2008. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, 69: 112-146
- Shibuya K, Paris S, Ando T, Nakayama H, Hatori T, Latge JP, 2006. Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 47: 249-255
- Smith ML, Bruhn JN, Anderson JB, 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, 356: 428-431
- Song XJ, 2020. The studies on low hydraulic resistance channels along meridians in rats and its morphology and differential proteome. PhD Dissertation, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing. 1-106 (in Chinese)
- Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJ, 2017. Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial Pathogenesis*, 110: 56-65
- Yang DH, Liu XH, Xu WT, Gu ZY, Yang CT, Zhang LZ, Tan JC, Zheng X, Wang Z, Quan S, Zhang YX, Liu Q, 2019. The *Edwardsiella piscicida* thioredoxin-like protein inhibits ASK1-MAPKs signaling cascades to promote pathogenesis during infection. *PLoS Pathogen*, 15(7): e1007917
- Zámocký M, Janeček Š, Obinger C, 2017. Fungal hybrid B heme peroxidases-unique fusions of a heme peroxidase domain with a carbohydrate-binding domain. *Scientific Reports*, 7(1): 9393

[附中文参考文献]

- 陈明义, 李福后, 边银丙, 2004. 蜜环菌不同菌株对天麻产量的影响. *食用菌学报*, 11(1): 46-48
- 郭顺星, 徐锦堂, 1990. 天麻消化紫萁小菇及蜜环菌过程中细胞超微结构变化的研究. *真菌学报*, 9(3): 218-225+249-251
- 郭顺星, 徐锦堂, 1992. 猪苓菌核的营养来源及其与蜜环菌的关系. *植物学报*, 34(8): 576-580+647-648
- 李兵, 王春兰, 邢咏梅, 曾旭, 田丽霞, 郭顺星, 2017. 猪苓菌丝形成菌核差异蛋白质组学研究. *菌物学报*, 36(1): 60-70
- 刘蒙蒙, 邢咏梅, 郭顺星, 2015. 药用真菌猪苓共生的蜜环菌种类研究. *中国药学杂志*, 50(5): 390-393
- 宋晓晶, 2020. 大鼠循经低流阻通道及其形态和差异蛋白质组学的研究. 中国中医科学院博士论文, 北京. 1-106

(本文责编: 韩丽)