

蜜环菌糖苷水解酶家族基因在菌索与菌丝间的差异表达分析

李兵 刘柳 单婷婷 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: 蜜环菌是一种兼性腐生和寄生的真菌,通过降解伴栽基质并为药用植物(天麻)或菌物(猪苓)提供营养物质,而糖苷水解酶是这一过程的主要酶类。本研究从蜜环菌 *Armillaria mellea* 541 菌株转录数据库中获糖苷水解酶家族基因 170 个,分布于 39 个亚家族。进一步分析发现,这些家族基因编码的糖苷水解酶家族蛋白(glycoside hydrolase family, GHF)结构域多达 48 种 181 个,以 Amy、Glyco_hydro、Melibiase_C、NodB homology 和 PA14 等结构域为主。对糖苷水解酶家族蛋白进行了系统的 Gene Ontology (GO) 功能注释和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 代谢通路分析,其功能以结合、水解和催化细胞壁成分为主。编码 GHF3 (A0A2H3D3T6)、GHF78 (A0A2H3D8T6)、GHF51 (A0A2H3E4X4)、GHF47 (A0A2H3EK71) 和 GHF5 (A0A2H3EBW7) 等 5 个糖苷水解酶家族蛋白的基因在 *A. mellea* 541 菌索与菌丝间差异表达,其结构域依次为 PA14、Bac_rhamnosid6H/C、Alpha-L-AF_C、Glyco_hydro_47 和 Glyco_hydro_5,可能发挥结合碳水化合物和催化鼠李糖苷、阿拉伯呋喃糖苷、甘露糖残基和纤维素等水解的功能,这为研究蜜环菌与天麻或猪苓的相互作用提供了理论依据。

关键词: 蜜环菌, 菌索, 糖苷水解酶家族, 糖苷水解酶结构域

[引用本文] 李兵, 刘柳, 单婷婷, 郭顺星, 2021. 蜜环菌糖苷水解酶家族基因在菌索与菌丝间的差异表达分析. 菌物学报, 40(6): 1369-1379

Li B, Liu L, Shan TT, Guo SX, 2021. Analyses of the glycoside hydrolase family genes and their differential expressions between rhizomorphs and hypha in *Armillaria mellea*. Mycosystema, 40(6): 1369-1379

基金项目: 国家自然科学基金(81773843, 81803666); 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

Received: 2021-02-28, accepted: 2021-04-08

Analyses of the glycoside hydrolase family genes and their differential expressions between rhizomorphs and hypha in *Armillaria mellea*

LI Bing LIU Liu SHAN Ting-Ting GUO Shun-Xing[✉]

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

Abstract: *Armillaria* sp. is a type of facultative saprophytic and parasitic fungus. It provides nutrients for medicinal plants (*Gastrodia elata*) or fungus (*Polyporus umbellatus*) by degrading the co-culture media and the glycoside hydrolase families (GHF) are the main enzymes in this process. In this study, 170 genes in 39 categories encoding GHF proteins were obtained from the transcription database of *Armillaria mellea* 541. Further analyses revealed that totally 181 domains of 48 classes were encoded by these GHF genes including Amy, Glyco_hydro, Melibiase_C, NodB homology and PA14 domains, etc. GO function annotation and KEGG metabolic pathway analysis and enrichment were performed on GHFs systematically and their molecular functions included binding, hydrolyzing and catalyzing cell wall components. Five genes encoding GHF3 (A0A2H3D3T6), GHF78 (A0A2H3D8T6), GHF51 (A0A2H3E4X4), GHF47 (A0A2H3EK71) and GHF5 (A0A2H3EBW7) expressed differently between rhizomorphs and hypha of *A. mellea* 541, containing PA14, Bac_rhamnosid 6H/C, Alpha-L-AF_C, Glyco_hydro_47 and Glyco_hydro_5 domains successively, which may play roles in binding carbohydrates and catalyzing the hydrolysis of rhamnoside, arabinofuranoside, mannose residues and cellulose. This study provided a useful reference for uncovering the interactions between *Armillaria* sp. and *Gastrodia elata* or *Polyporus umbellatus*.

Key words: *Armillaria mellea*, rhizomorphs, glycoside hydrolase family, glycoside hydrolase domain

蜜环菌与天麻或者猪苓形成共生关系，而菌索是构建这种关系的“桥梁”。一方面蜜环菌分解营养源（如壳斗科枝叶等），吸收并通过菌索将营养物质传递给宿主（郭顺星和徐锦堂 1990）。另一方面，蜜环菌侵入天麻或猪苓菌核后，建立起共生关系，这一过程也是相互消解和防御的过程，蜜环菌消解猪苓菌核内部的菌丝而诱发猪苓菌核形成隔离腔，以阻止蜜环菌的进一步侵染；而猪苓

菌核也可以分解隔离腔内的蜜环菌菌丝体，吸收降解产物，供给自身生长发育（郭顺星和徐锦堂 1992）。蜜环菌可分泌释放胞外酶，如纤维素酶、木聚糖酶等，这些胞外酶的活性越高，蜜环菌菌株越优良（刘天睿等 2019；刘晓敏等 2020）。同一蜜环菌菌株对不同树种枝条的侵染效果不同，蜜环菌萌发速度、长势、分枝数量等也不尽相同（任思竹等 2014）。木质纤维素是蜜环菌寄生或腐生树种

的主要成分,蜜环菌可分泌胞外纤维素酶,降解利用纤维素(赵佳等 2018),其降解效率与纤维素酶酶活关系密切(杨静等 2015)。无论降解的是树还是猪苓或天麻,它们的细胞壁主要组成成分均是多糖,由单糖以糖苷键的方式聚合而成。糖苷水解酶则是降解多糖的关键酶,但是,蜜环菌糖苷水解酶尚缺乏系统的研究。

本研究基于蜜环菌 *A. mellea* 541 转录测试结果,筛选出编码糖苷水解酶家族基因,并进行了系统的分析,获得了蜜环菌菌丝形成菌索过程中差异表达的糖苷水解酶家族基因,这为后期研究蜜环菌与猪苓或天麻的相互作用提供了坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为 *Armillaria mellea* 541, 保藏于中国医学科学院药用植物研究所菌根研究室。用固体培养基(锯末 750g、麦麸 250g、葡萄糖 10g、去离子水 1 000mL)培养 *A. mellea* 541 菌株,待其生长旺盛时,挑取固体基质菌种适量,接种于马铃薯琼脂糖培养基中,室温、避光培养,获得试验用的 *A. mellea* 541 菌丝体 (*Armillaria hypha*, AH) 和菌索 (*Armillaria rhizomorphs*, AR)。

1.2 蜜环菌糖苷水解酶家族基因分析

本课题组对 *A. mellea* 541 的菌丝体和菌索进行了系统的转录组测试及分析,获得了该菌株的 unigene 数据库,并已上传至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 登录号 (SUB8218370)。本研究从该数据库中提取出所有糖苷水解酶家族的 unigene 信息,包括编号、名称、序列信息等;利用 protparam 在线工具(<https://web.expasy.org/protparam>)对这些糖苷水解酶家族基因进行理化参数预测分析;利用 uniprot 在线注释工具([https://](https://www.uniprot.org/)

www.uniprot.org/) 和 pfam 结构域预测在线工具 (<http://pfam.xfam.org/>) 对糖苷水解酶家族基因进行注释和结构域分析;继而对糖苷水解酶种类和结构域类型进行统计分析。

1.3 蜜环菌糖苷水解酶家族蛋白生物信息学分析

利用 omicsbeanTM (<http://www.omicsbean.cn/>) 在线工具,对 *A. mellea* 541 糖苷水解酶家族蛋白进行系统的 Gene Ontology (GO) 注释(包括细胞组成 cell component、分子功能 molecular function 和生物学过程 biological process) 和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 代谢通路分析。

1.4 蜜环菌菌索与菌丝间差异表达的糖苷水解酶家族基因

从 *A. mellea* 541 转录组数据库中搜索提取出糖苷水解酶家族基因的 RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) 数据,公式 $\log_2 \frac{RPKM(AR)}{RPKM(AH)}$ 计算糖苷水解酶家族基因在菌索与菌丝中表达量的比值,每组 3 个生物学重复,继而获得蜜环菌菌索与菌丝间的差异表达 (Fold change $\geq$ 1.50 或 $\leq$ 0.67, $P\leq$ 0.05) 的糖苷水解酶家族基因。利用 NCBI 引物设计在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计差异表达基因的正反引物序列(表 1),以延伸因子-1 γ 为内参基因(正向引物 5'-TGCTCGGCTCGACTCCAGAA GA-3',反向引物 5'-TGGCACCGCATTGGATGAAG GC-3'),然后用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 验证。

2 结果与分析

2.1 蜜环菌糖苷水解酶家族基因

从 *A. mellea* 541 菌株的转录组数据库中共同提取糖苷水解酶家族基因 170 个,并通过注释名称进行了初步统计分析。结果表明, *A. mellea* 541 基因编码的糖苷水解酶家族蛋白共计

表 1 *Armillaria mellea* 541 菌索与菌丝差异表达的糖苷水解酶基因

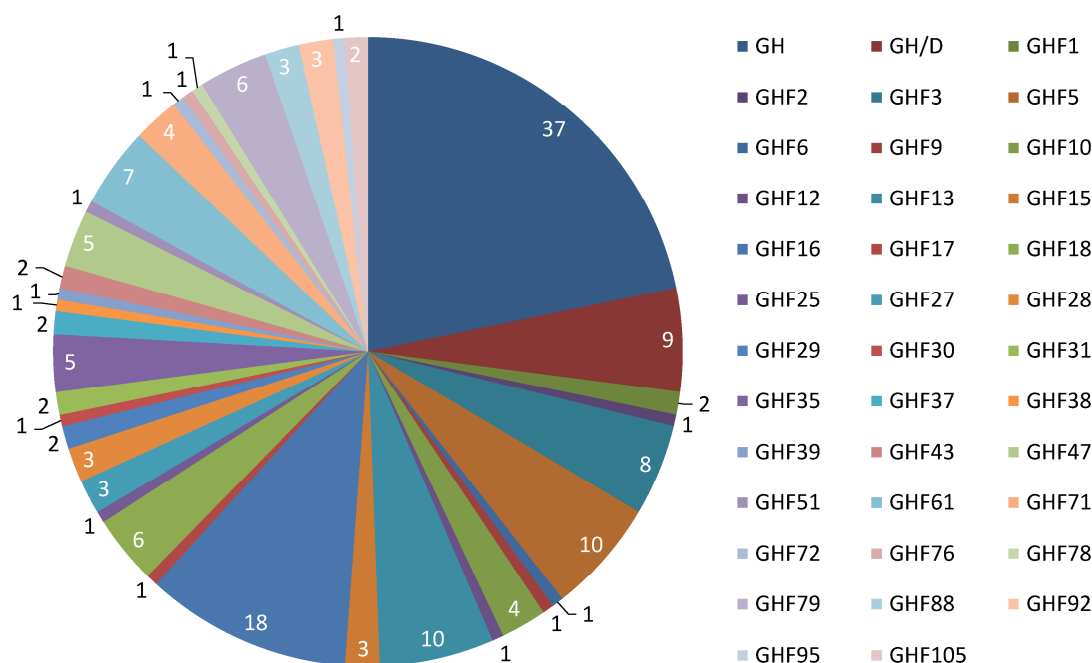
Table 1 Differentially expressed glycoside hydrolase family genes between rhizomorphs and hypha of *Armillaria mellea* 541

基因	基因描述	氨基酸数	相对分子量	等电点	结构域	结构域功能	引物序列
Gene	Gene description	Numbers of aa	Molecular weight	Theoretical pI	Domain	Domain's function	Primer sequence (5'-3')
GHF3	糖苷水解酶家族 3 蛋白	855	93.9	5.67	PA14	碳水化合物结合功能，而非催化	CAGCCACATTCGAGCTAACA
	Glycoside hydrolase family 3 protein					Binding rather than catalyzing carbohydrate	CAAGGTCCTCGCTACTCAGG
GHF78	糖苷水解酶家族 78 蛋白	751	80.2	4.59	Bac_rhamnosid6H	鼠李糖苷可作为植物的信号物质，	CAATCTGATGACGCTTGCCG
	Glycoside hydrolase family 78 protein				Bac_rhamnosid_C	也具有致病菌的抗原性，该类别结构域均可水解鼠李糖苷	GCGCTAAGGCTGTGTCACT
GHF51	糖苷水解酶家族 51 蛋白	497	56.1	5.91	Alpha-L-AF_C	Rhamnoside can be used as a signal substance in plants and antigen of pathogen, and can be hydrolyzed by these domains	TCGAGCATATGGGACGATGC
	Glycoside hydrolase family 51 protein					催化含阿拉伯糖的多糖中非还原性末端 α -L-阿拉伯呋喃糖苷键水解	GGTCCTTCAACACACGGCCATA
GHF47	糖苷水解酶家族 47 蛋白	533	58.7	4.47	Glyco_hydro_47	Catalyze hydrolysis of α -L-arabinoglycoside bond of nonreducing terminal of polysaccharides containing arabinose	TACACCTGCGACTACGATGC
	Glycoside hydrolase family 47 protein					催化寡糖 Man（9）（GlcNAc）（2）中末端 1, 2-连接的 α -D-甘露糖残基水解	TCCGAGTAGGGTTCCACCAT
GHF5	糖苷水解酶家族 5 蛋白	420	45.9	5.12	Glyco_hydro_5	Catalyze hydrolysis of 1, 2-linked α -D-mannose residues in the terminal of oligosaccharide Man (9) (GlcNAc) (2)	CTGTCTGCGGAGTTTCCTTC
	Glycoside hydrolase family 5 protein				(Cellulase)	催化纤维素水解	GTACTGCCCCGAATGTCCACT
注：退火温度均为 60℃							
Note: Annealing temperature was 60℃ for each procedure.							

39 类, 其中糖苷水解酶 (glycoside hydrolase, GH) 37 个, 糖苷水解酶家族 16 蛋白 18 个, 糖苷水解酶家族 5 和 13 家族蛋白均为 10 个, 糖苷水解酶/去乙酰化酶 9 个, 糖苷水解酶家族 3 蛋白 8 个, 其余水解酶家族蛋白种类和数量见图 1 和附表 1。这些糖苷水解酶家族蛋白理化参数见附表 1。

在此基础之上, uniprot 和 pfam 在线注释工具对糖苷水解酶 (GH)、糖苷水解酶/去乙酰化酶 (GH/D) 等进行的进一步结构域分析表明, *A. mellea* 541 菌株糖苷水解酶具有的结构域包括 Amy、Alpha-L-AF_C、Bac_rhamnosid 6H/C、Beta Gal_dom2、CBM_20、Fn3_like、GDE types (hGDE_N, hDGE_amylase, hGDE_central 和 GDE_C)、Glyco_hydro_1、Glyco_hydro_2、Glyco_hydro_5、Glyco_hydro_10、Glyco_hydro_16、Glyco_hydro_17、Glyco_hydro_18、Glyco_hydro_28、Glyco_hydro_29、

Glyco_hydro_43、Glyco_hydro_47、Glyco_hydro_61、Glyco_hydro_71、Glyco_hydro_79C、Glyco_hydro_88、Glyco_hydro_92、Ig_mannosidase、Mannosidase_ig、Melibiase_C、NodB homology、PA14、PX 等共计 48 类, 其中数量较多的结构域为 Glyco_hydro_16、Glyco_hydro_5、Glyco_hydro_1、Glyco_hydro_18、NodB homology, 占比依次为 9.94%、9.39%、6.63%、5.52%和 4.97%, 其余结构域数量见图 2。其他类型结构域指 Alpha-mann_mid、CBM_1、Gal_mutarotas_2、Glyco_hydro_3、Glyco_hydro_6、Glyco_hydro_9、Glyco_hydro_12、Glyco_hydro_13、Glyco_hydro_15、Glyco_hydro_25、Glyco_hydro_30、Glyco_hydro_31、Glyco_hydro_35、Glyco_hydro_37、Glyco_hydro_39、Glyco_hydro_63、Glyco_hydro_76、Trehalase_Ca-bi 和 X8 等 19 种, 数量均为 1。



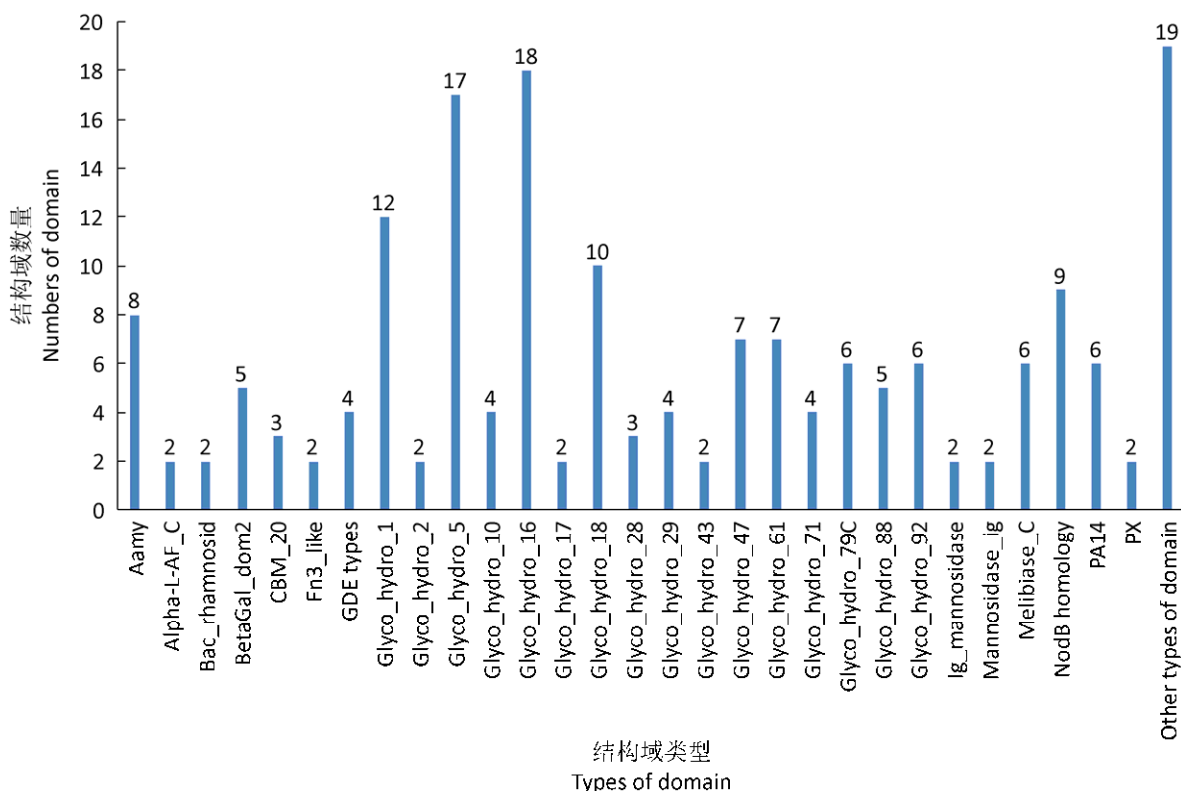


图 2 *Armillaria mellea* 541 编码的糖苷水解酶家族蛋白结构域统计分析 Glyco_hydro: 糖苷水解酶家族; Aamy: α 淀粉酶催化结构域; Alpha-L-AF_C: α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 C 末端结构域; Bac_rhamnosid 6H/C: 细菌 α -L-鼠李糖苷酶 6 发夹糖苷酶结构域/C-末端结构域; BetaGal_dom2: β -半乳糖苷酶结构域 2; CBM_20: 碳水化合物结合模块家族 20; Fn3_like: 纤连蛋白 III 型结构域; GDE: 人糖原解支酶的 N 末端结构域; Mannosidase_ig: CBM 样结构域; Ig_mannosidase: Ig-fold 结构域; Melibiase_C: α 半乳糖苷酶 C 端 β -三明治结构域; NodB homology: 结瘤蛋白 B 同源结构域; PA14: PA14 结构域; PX: PhoX 同源结构域

Fig. 2 The statistical results of domains of glycoside hydrolase family proteins encoded by unigenes of *Armillaria mellea* 541. Glyco_hydro: Glycoside hydrolase family; Aamy: Alpha amylase catalytic domain; Alpha-L-AF_C: Alpha-L-arabinofuranosidase C-terminal domain; Bac_rhamnosid 6H/C: Bacterial alpha-L-rhamnosidase 6 hairpin glycosidase domain/C-terminal domain; BetaGal_dom2: Beta-galactosidase, domain 2; CBM_20: Carbohydrate-binding module family 20; Fn3_like: Fibronectin type III-like domain; GDE: N-terminal domain from the human glycogen debranching enzyme; Mannosidase_ig: CBM-like domain; Ig_mannosidase: Ig-fold domain; Melibiase_C: Alpha galactosidase C-terminal beta sandwich domain; NodB homology: Nodulation protein B homology; PA14: PA14 domain; PX: PhoX homologous domain.

2.2 蜜环菌糖苷水解酶功能注释

对 *A. mellea* 541 糖苷水解酶家族基因编码的 170 个蛋白进行了系统的 GO 功能注释和 KEGG 代谢通路分析。细胞组成分析结果表明, 25 个糖苷水解酶家族蛋白分布于细胞外围 (cell periphery), 12 个位于真菌细胞壁

(fungal-type cell wall), 10 个为胞外蛋白 (extracellular region), 其余蛋白的细胞分布见图 3A。

GO 注释之分子功能分析结果表明, 有 81 个糖苷水解酶具有催化活性 (catalytic activity), 73 个糖苷水解酶发挥水解活性 (hydrolase

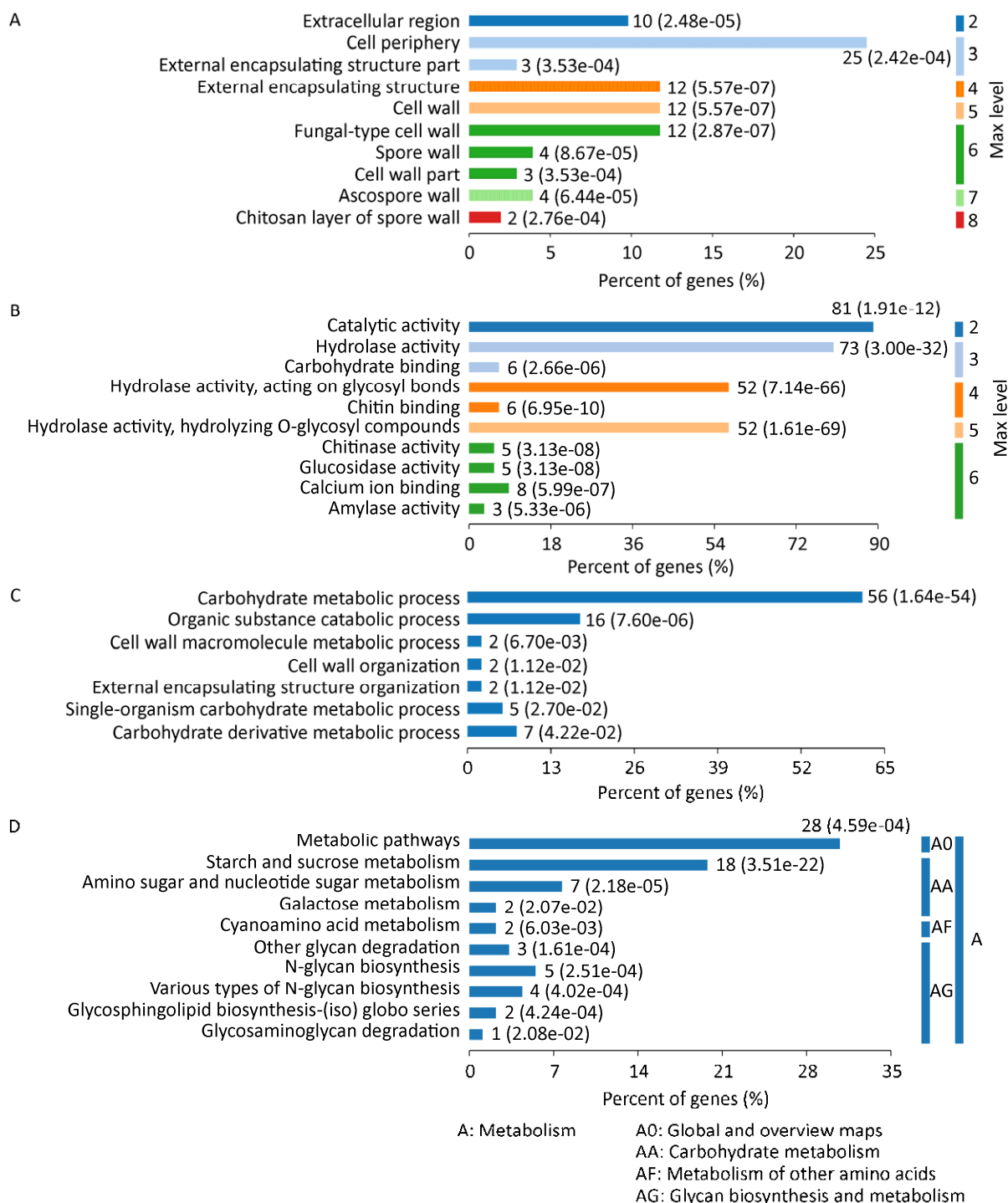


图 3 *Armillaria mellea* 541 糖苷水解酶家族蛋白 GO 注释和 KEGG 代谢通路分析富集结果 A: 糖苷水解酶家族蛋白细胞组成分析和富集结果; B: 糖苷水解酶家族蛋白分子功能分析和富集结果; C: 糖苷水解酶家族蛋白参与的生物学过程分析和富集结果; D: 糖苷水解酶家族蛋白 KEGG 代谢通路分析和富集结果

Fig. 3 The GO annotation and KEGG pathway analysis and enrichment results of glycoside hydrolase family (GHF) of *Armillaria mellea* 541. A: Cell component analysis and enrichment results of GHF; B: Molecular function analysis and enrichment results of GHF; C: Biological process analysis and enrichment results of GHF; D: KEGG pathway analysis and enrichment results of GHF.

activity), 52 个糖苷水解酶可催化反应糖苷键 (glycosyl bonds), 52 个糖苷水解酶可水解 O-糖苷键化合物 (O-glycosyl compounds), 11 个糖苷水解酶发挥几丁质结合 (chitin binding) 和几丁质酶活性 (chitinase activity), 8 个糖苷水解酶还具有钙离子结合功能 (calcium binding) (图 3B)。

GO 注释之生物学过程分析结果表明, 碳水化合物代谢是蜜环菌糖苷水解酶家族蛋白的主要生物学过程, 包括蛋白参与碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolic process) (56 个)、单细胞器碳水化合物代谢 (single-organism carbohydrate metabolic process) (5 个) 和碳水化合物衍生物代谢过程 (carbohydrate derivative metabolic process) (7 个)。此外, 有机物催化代谢 (organic substance catabolic process) 也是蜜环菌糖苷水解酶家族蛋白的一类生物学功能 (16 个蛋白)。从占比上分析, 能被注释生物学过程的蜜环菌糖苷水解酶家族蛋白数量较少, 需要深入研究 (图 3C)。

KEGG 代谢通路分析结果表明, 28 个糖苷水解酶均与代谢通路 (metabolic pathways) 相关, 以碳水化合物代谢为主, 其中 18 个糖苷水解酶参与淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism), 7 个参与氨基糖和核糖代谢 (amino sugar and nucleotide sugar metabolism)。多糖代谢也是糖苷水解酶参与的重要反应途径, 包括 N-糖链生物合成 (N-glycan biosynthesis)、糖胺聚糖 (粘多糖) 降解 (glycosaminoglycan degradation) 等 (图 3D)。

2.3 蜜环菌菌索与菌丝间差异表达的糖苷水解酶家族基因

在 *A. mellea* 541 菌索与菌丝转录组测试差异表达基因中, 糖苷水解酶家族基因共计 5 个 (表 1 和图 4), 依次编码糖苷水解酶家族

3 蛋白 (GHF3, A0A2H3D3T6)、糖苷水解酶家族 78 蛋白 (GHF78, A0A2H3D8T6)、糖苷水解酶家族 51 蛋白 (GHF51, A0A2H3E4X4)、糖苷水解酶家族 47 蛋白 (GHF47, A0A2H3EK71) 和糖苷水解酶家族 5 蛋白 (GHF5, A0A2H3EBW7), 分属 5 个不同的家族。这些基因在菌索与菌丝间差异表达的比值 (AR/AH) 依次为 2.52、3.23、1.92、-2.77 和 -2.07 (以 RPKM 计), 即 *GHF47* 和 *GHF5* 下调表达, 其余 3 个基因上调表达。

以 EF-1 γ 为内参基因的 qRT-PCR 结果表明, *GHF3*、*GHF78*、*GHF51*、*GHF47* 和 *GHF5* 等 5 个基因在菌索与菌丝中差异表达, 比值依次为 2.82、3.79、1.33、0.37 和 0.29, 这与基于 RPKM 计算的一致, 进一步证实这 5 个基因在 *A. mellea* 541 菌索与菌丝间差异表达 (图 4)。

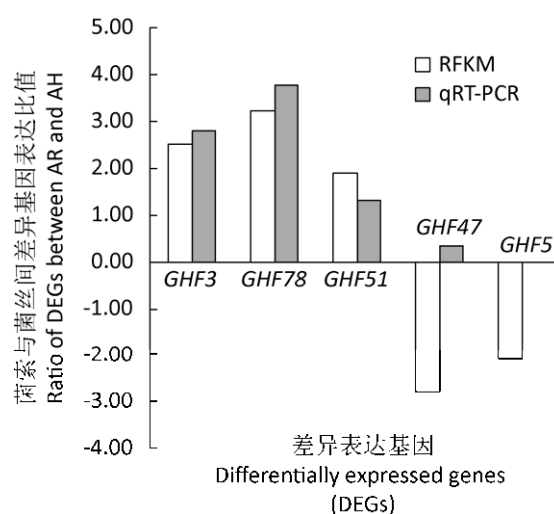


图 4 *Armillaria mellea* 541 菌索与菌丝差异表达的糖苷水解酶家族基因及其比值 RPKM 是基于转录组定量测试的结果, 基因在菌索与菌丝间的比值由 $\log_2 \frac{RPKM(AR)}{RPKM(AH)}$ 计算而得

Fig. 4 The ratio of differentially expressed genes (DEGs) between rhizomorphs (AR) and hyphae (AH) of *Armillaria mellea* 541. The ratio of DEGs between AR and AH based on RPKM from transcript abundance were calculated by $\log_2 \frac{RPKM(AR)}{RPKM(AH)}$.

这 5 个差异表达基因编码蛋白预测的理化参数和结构域见表 1, 氨基酸数量介于 420–855 之间, 相对分子量 45.9–93.9kDa, 等电点 4.47–5.91。这些糖苷水解酶家族蛋白具有 6 种结构域, 依次为 PA14 (A0A2H3D3T6)、Bac_rhamnosid6H 和 C (A0A2H3D8T6)、Alpha-L-AF_C (A0A2H3E4X4)、Glyco_hydro_47 (A0A2H3EK71) 和 Glyco_hydro_5 (A0A2H3EBW7), 发挥结合碳水化合物、催化鼠李糖苷水解、催化 α -L-阿拉伯呋喃糖苷键水解、 α -D-甘露糖残基水解和纤维素水解等生物学功能。

3 讨论

蜜环菌是我国传统药用植物天麻或菌物猪苓的营养供给体, 消解伴栽基质(如椴木、树叶等)并吸收降解产物。蜜环菌与天麻或猪苓(宿主)建立共生关系, 也需要侵染并降解二者的皮层或菌核。无论消解基质或宿主, 其主要的底物均为细胞壁, 一种主要由多糖构成的组织结构, 而功能性酶则以糖苷水解酶为主(赵佳等 2018; 刘晓敏等 2020)。但是, 蜜环菌糖苷水解酶尚缺乏系统的研究。本研究从蜜环菌 *A. mellea* 541 中获得糖苷水解酶家族基因 170 个, 这些基因编码糖苷水解酶家族蛋白结构域 48 种共 181 个。与菌丝相比, 糖苷水解酶家族 3 蛋白(A0A2H3D3T6)等 5 个蛋白在菌索中差异表达, 结构域也分属不同类别, 发挥碳水化合物结合、催化水解等生物学功能。

A. mellea 541 中的糖苷水解酶家族基因可编码的蛋白酶类别多样(38 亚家族), 数量众多(170 个), 包括几丁质酶、岩藻糖苷酶、木酶、甘露糖苷酶、葡萄糖苷酶、淀粉酶、纤维素酶等(附表 1), 表明蜜环菌具有表达不同功能的糖苷水解酶的潜力, 其降解多糖底物是诸多酶协作的进程, 底物不同则

蜜环菌糖苷水解酶基因表达情况可能有所差别(Keegstra 2010; Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos 2019)。在猪苓的生长过程中, 蜜环菌的生长可以分为两个阶段, 即形成菌材阶段和蜜环菌-猪苓菌核互作阶段。形成菌材时, 蜜环菌主要降解如纤维素、半纤维素等木材的细胞壁成分, 此时纤维素酶等相关基因及蛋白可能表达显著。如将蜜环菌与榛子木材培养 1 年后, 木质素、综纤维素均能降解(赵佳等 2018)。蜜环菌降解木质纤维素的能力还与菌种类别相关, *A. mellea* 纤维素利用率与纤维素酶活性呈正相关关系(杨静等 2015)。在本研究中, 编码糖苷水解酶家族 5 蛋白(A0A2H3EBW7)蛋白的 *GHF5* 在 *A. mellea* 541 菌索中下调表达(AR/AH 0.29), 即 *GHF5* (A0A2H3EBW7) 在菌丝中被大量合成及释放, 用以降解纤维素。蜜环菌与猪苓菌核互作时, 猪苓是药用真菌, 且高度细胞壁化(Xing *et al.* 2013), 其组成以几丁质为主, 那么蜜环菌几丁质酶等可能会持续表达和释放。*A. mellea* 541 含有相当数量的几丁质酶(糖苷水解酶家族 18 蛋白), 包括如 Glyco_hydro_18、PX 等多种结构域。一般而言, 真菌的几丁质酶都分属糖苷水解酶家族 18 蛋白, 本研究结果表明蜜环菌亦是如此。几丁质酶发挥底物辅助催化反应和催化糖基化反应功能(Hartl *et al.* 2012), 将烟曲霉 *Aspergillus fumigates* 几丁质酶 ChiB1 的一些氨基酸位点突变, ChiB1 失去糖基转移活性, 酶活丧失(Lü *et al.* 2009)。推测糖苷水解酶家族 18 蛋白在蜜环菌与猪苓菌核相互作用过程中也可能发挥类似的功能, 需后续深入的研究。

蜜环菌 *A. mellea* 541 糖苷水解酶家族基因编码的糖苷水解酶家族蛋白结构域多达 48 种共 181 个(图 2 和附表 1), 高于糖苷水解酶家族蛋白数量(170 个), 蛋白功能取决于

结构域,表明一种糖苷水解酶家族蛋白可能具有多种生物学功能。*A. mellea* 541 菌丝形成菌索过程中,编码 GHF3 (A0A2H3D3T6) 和 GHF78 (A0A2H3D8T6) 的基因差异表达,依次编码 PA14 和 Bac_rhamnosid6H/C 结构域。GHF3 特别之处是结构中引入了 PA14 结构域,该结构域具有 β -barrel 结构,发挥碳水化合物或肽聚糖结合而非催化的生物学功能,是分子间相互作用的蛋白 (Rigden *et al.* 2004; Yoshida *et al.* 2010)。鼠李糖苷是糖脂和糖苷的常见成分,是致病菌的抗原活性物质,若在植物体内还可以作为信号物质;Bac_rhamnosid 6H/C 是 GHF78 (A0A2H3D8T6) 的两个结构域,可以选择性的催化水解鼠李糖苷 (Yadav *et al.* 2010)。菌索作为蜜环菌功能的主要组织形态,是侵染宿主和传递营养物质的结构 (Baumgartner *et al.* 2011), GHF3 和 GHF78 在 *A. mellea* 541 菌索中上调表达,表明菌索对栽培基质(如木材)或宿主(猪苓或天麻)细胞壁成分的结合可能会增强,促进催化水解活性;此外,鼠李糖苷作为信号物质是否在天麻细胞壁中也存在,而 GHF78 水解鼠李糖苷后又是否会激活天麻的防御反应信号,需要探索研究。

[REFERENCES]

- Baumgartner K, Coetzee MP, Hoffmeister D, 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Molecular Plant Pathology*, 12: 515-534
- 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 umbellata* and its relationship to *Armillaria mellea*. *Acta Botanica Sinica*, 34(8): 576-580+647-648 (in Chinese)
- Hartl L, Zach S, Seidl-Seiboth S, 2012. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 533-543
- Keegstra K, 2010. Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154(2): 483-486
- Liu TR, Zhang WW, Wang ZQ, Yang QS, Xu HY, Song HM, Bao HY, 2019. Law of content change of extracellular enzymes and polysaccharides in *Armillaria gallica*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 42(1): 57-61 (in Chinese)
- Liu XM, Chen XD, Zhang WW, Wang ZQ, Song MH, Lan J, Ma L, 2020. Identification of different *Armillaria* spp. strains and extracellular enzyme activity. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 36(24): 99-106 (in Chinese)
- Lü Y, Yang H, Hu H, Wang Y, Rao Z, Jin C, 2009. Mutation of Trp137 to glutamate completely removes transglycosyl activity associated with the *Aspergillus fumigatus* AfChiB1. *Glycoconjugate Journal*, 26(5): 525-534
- Ren SZ, Chen QJ, Cheng JH, 2014. Infection effect on fifteen different kinds of tree species by *Armillariella mellea*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 30(22): 69-73 (in Chinese)
- Rigden DJ, Mello LV, Galperin MY, 2004. The PA14 domain, a conserved all-b domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(7): 335-339
- Ruiz-Herrera J, Ortiz-Castellanos L, 2019. Cell wall glucans of fungi, a review. *Cell Surface*, 5: 100022
- Xing YM, Zhang LC, Liang HQ, Lü J, Song C, Guo SX, Wang CL, Lee TS, Lee MW, 2013. Sclerotial formation of *Polyporus umbellatus* by low temperature treatment under artificial conditions. *PLoS One*, 8(2): e56190
- Yadav V, Yadav PK, Yadav S, Yadav KDS, 2010. α -L-rhamnosidase: a review. *Process Biochemistry*, 45(8): 1226-1235
- Yang J, Gui Y, Huang WB, Yang M, Zhu GS, Liu CG, 2015. Research on utilization ratio of

- lignocelluloses of different *Armillariella mellea*. Northern Horticulture, 11: 133-137 (in Chinese)
 - Yoshida E, Hidaka M, Fushinobu S, Koyanagi T, Minami H, Tamaki H, Kumagai H, 2010. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. Biochemical Journal, 431(1): 39-49
 - Zhao J, Liu XF, Lin HB, Bai YF, Liu J, 2018. FTIR analysis on the structure and compositions changes of lignocelluloses of *Corylus heterophylla* degraded by *Armillaria mellea*. Journal of West China Forestry Science, 47(1): 97-103 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 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
 - 刘天睿, 张薇薇, 王忠巧, 杨勇述, 徐怀有, 宋明海, 包海鹰, 2019. 蜜环菌胞外酶和多糖含量变化规律研究. 中药材, 42(1): 57-61
 - 刘晓敏, 陈向东, 张薇薇, 王忠巧, 宋明海, 兰进, 马琳, 2020. 不同蜜环菌菌株的鉴定及胞外酶活性研究. 中国农学通报, 36(24): 99-106
 - 任思竹, 陈青君, 程继鸿, 2014. 蜜环菌对 15 种不同树种枝条的侵染效果. 中国农学通报, 30(22): 69-73
 - 杨静, 桂阳, 黄万兵, 杨梅, 朱国胜, 刘朝贵, 2015. 不同蜜环菌菌株对木质纤维素利用率研究. 北方园艺, 11: 133-137
 - 赵佳, 刘雪峰, 林海波, 白云帆, 刘静, 2018. FTIR 法研究蜜环菌降解前后榛子木材木质纤维素结构及成分的变化. 西部林业科学, 47(1): 97-103

(本文责编: 韩丽)