

DOI: 10.16861/j.cnki.zggc.2025.0011

AMPK 在糙皮侧耳生长发育不同阶段及非生物胁迫下的差异表达

李会会, 陈朝阳, 郑秀坤, 文 晴, 刘 晴, 戚元成, 王凤芹, 胡廷如, 申进文

(河南农业大学生命科学学院 郑州 450002)

摘要:为探究 AMPK(AMP 激活的蛋白激酶) α 、 β 和 γ 3 个亚基在糙皮侧耳生长发育不同阶段以及多种非生物胁迫下的表达特性, 首先通过同源性比对获得糙皮侧耳 AMPK 3 个亚基序列, 然后通过 qPCR 探究 AMPK 3 个亚基在生长发育不同阶段、营养胁迫、温度胁迫、重金属胁迫、氧化胁迫和盐胁迫下的相对表达量。结果表明, *AMPK α* 亚基在糙皮侧耳子实体发育初期、原基期和子实体期、温度胁迫、重金属胁迫和氧化胁迫中高表达; *AMPK β* 亚基在子实体发育初期、营养胁迫、重金属胁迫、盐胁迫下高表达; *AMPK γ* 亚基仅在子实体发育初期和温度胁迫中热胁迫下表达量升高。以上结果说明, AMPK 3 个亚基响应不同的环境胁迫, 可能具有不同的调控功能, 其中, *AMPK α* 亚基在 AMPK 调控功能中起关键作用。研究结果为进一步深入了解 AMPK 3 个亚基在糙皮侧耳生长发育及不同胁迫中的功能奠定了基础, 也为糙皮侧耳抗逆研究提供了创新思路。

关键词: AMPK; qPCR; 糙皮侧耳; 非生物胁迫

中图分类号: S646.1⁴¹

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)08-045-07

Differential expression of AMPK in different stages of growth and development of *Pleurotus ostreatus* and under abiotic stress

LI Huihui, CHEN Zhaoyang, ZHENG Xiukun, WEN Qing, LIU Qing, QI Yuancheng, WANG Fengqin, HU Yanru, SHEN Jinwen

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract: To explore the expression characteristics of the three subunits α , β , and γ of AMPK (AMP-activated protein kinase) during different stages of the growth and development of *Pleurotus ostreatus* and under various abiotic stresses, this study first obtained the sequences of the three subunits of AMPK in *P. ostreatus* through homology alignment. Then, qPCR was used to investigate the relative expression levels of the three subunits of AMPK during different stages of growth and development, as well as under nutritional stress, temperature stress, heavy metal stress, oxidative stress, and salt stress. The results showed that the *AMPK α* subunit was highly expressed during the initial stage of fruiting body development, the primordium stage, the fruiting body stage of *P. ostreatus*, as well as under temperature stress, heavy metal stress, and oxidative stress. The *AMPK β* subunit was highly expressed during the initial stage of fruiting body development, under nutritional stress, heavy metal stress, and salt stress. The expression level of the *AMPK γ* subunit only increased during the initial stage of fruiting body development and under heat stress within temperature stress. The above results indicate that the three subunits of AMPK respond to different environmental stresses and may have different regulatory functions. Among them, the *AMPK α* subunit plays a key role in the regulatory function of AMPK. This study lays a foundation for further in-depth exploration of the functions of the three subunits of AMPK during the growth and development of *P. ostreatus* and under different stresses, and also provides innovative ideas for the study of the stress resistance of *P. ostreatus*.

Key words: AMPK; qPCR; *Pleurotus ostreatus*; Abiotic stress

收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-27

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS20); 国家自然科学基金(32202571); 河南省重大公益专项(201300110700); 河南省农业良种攻关联合项目(2022030101)

作者简介: 李会会, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为食药真菌。E-mail: 15838340860@163.com

通信作者: 申进文, 男, 教授, 研究方向为食药真菌。E-mail: shenjinwen@henau.edu.cn

糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)俗称平菇,是我国乃至世界主栽食用菌种类之一,栽培原料来源广泛^[1]。糙皮侧耳不仅具有丰富的营养价值和独特风味,还能在抗氧化、抗炎、抗病毒和免疫刺激等方面发挥作用^[2]。我国糙皮侧耳的种植以传统大棚为主,该种植方式具有节省资源以及方便快捷等优势,但是大棚环控能力差,糙皮侧耳生长极易受到环境条件的影响^[3]。2021年河南遭受暴雨洪涝灾害,全省香菇、平菇、木耳、草菇等食用菌产量受损,造成直接经济损失近1亿元^[4]。近年来,全球气候变暖与极端天气造成了我国各地食用菌一定程度的减产甚至绝收,由于食用菌生产对气候变化的适应性不足,无法应对天气变化带来的挑战,外界环境胁迫严重威胁糙皮侧耳子实体的生长与品质^[5]。

AMP激活的蛋白激酶(AMPK)是由 α 、 β 和 γ 亚基构成的异源三聚体,在真核生物中高度保守,作为一种感知和调节生物体胞内能量水平的关键因子,在维持生物体代谢平衡和调控生长发育中发挥着重要作用^[6]。AMPK在微生物中又称Sucrose-nonfermenting 1(SNF1),可以被氧化应激、葡萄糖剥夺、内质网应激等应激途径激活,参与胞内的葡萄糖代谢、脂质代谢和蛋白质代谢等,此外,还可以调节线粒体的生物合成和自噬^[7-8]。

AMPK α 亚基是催化亚基,N端包含了丝/苏氨酸蛋白激酶结构域和保守的苏氨酸磷酸化位点,该位点磷酸化可以直接激活该激酶的催化活性,在C端含有一个与调节亚基形成复合物的调节结构域^[9]。在哺乳动物体内,存在2个AMPK α 亚基,即AMPK α 1和AMPK α 2;真菌中存在一个AMPK α 亚基的同源蛋白SNF1;植物中存在3个AMPK α 亚基的同源蛋白,分别为蔗糖非发酵相关蛋白激酶1 α 1(SNRK1 α 1)、蔗糖非发酵相关蛋白激酶1 α 2(SNRK1 α 2)和蔗糖非发酵相关蛋白激酶1 α 3(SNRK1 α 3),不过SNRK1 α 3较为罕见^[10]。在植物遭遇盐胁迫、高渗胁迫等非生物胁迫时,SNRK1 α 被诱导激活,进而调控细胞内可溶性糖、淀粉含量以及ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)活性,增强植株的抗逆能力^[11]。在灵芝中,SNF1受热胁迫诱导激活后,通过提高细胞内无氧糖酵解速率来减少活性氧积累,从而对灵芝的次生代谢产生影响^[12]。

AMPK β 和 γ 亚基作为调节亚基,可以和 α 亚基的调节结构域直接互作,协同发挥作用。 β 亚基通常作为连接 α 和 γ 亚基的桥梁,其N端是一段可变基序,含有一个糖类结合元件CBM,C端用来结

合 α 和 γ 亚基; γ 亚基含有核苷酸结合位点,包含4个串联的胱硫氨酸 β 合酶(CBS)基序,用来响应AMP、ADP和ATP水平的变化^[13]。在酿酒酵母中,含有3个 β 亚基(SIP1、SIP2、GAL83), β 亚基的亚细胞定位会影响SNF1在酵母中的调控功能,进而影响菌体对非生物胁迫的抗逆能力:在缺少葡萄糖时,SIP1、SIP2、GAL83分别定位于液泡、细胞质、细胞核,葡萄糖回补后则定位于细胞质中;SIP1过表达菌株在高乙醇条件下成活率较高;GAL83在碱性胁迫下定位于细胞核,负责调控碳源^[14-15]。哺乳动物中有3个 γ 亚基AMPK γ 1、AMPK γ 2、AMPK γ 3;酵母和白色念珠菌中只有1个由SNF4编码的 γ 亚基;白色念珠菌中的SNF4介导葡萄糖等碳源代谢、参与细胞壁合成、影响菌株对化学药物的抵抗能力^[16,17]。细胞受到外界环境的压力,胞内代谢失衡,AMPK 3个亚基通过形成复合物来调控代谢稳态;此外,AMPK的3个亚基也可以独立于三聚体复合物响应多种非生物胁迫的诱导^[18]。

AMPK蛋白激酶广泛存在于各种真核生物中,参与生物体的生长代谢调控及多种非生物胁迫响应,但目前在食用菌中研究较少,并且AMPK 3个亚基在糙皮侧耳生长代谢及非生物胁迫下的调控机制尚不清楚。笔者旨在通过对AMPK 3个亚基在糙皮侧耳不同生长发育阶段,以及各种非生物胁迫下的表达特性分析,初步解析3个亚基可能调控的抗逆途径,为后续深入研究AMPK 3个亚基在糙皮侧耳不同胁迫下的调控功能提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2023年12月至2024年5月在河南农业大学生命科学学院实验楼进行。

1.1.1 菌株 糙皮侧耳(*P. ostreatus*)菌株X831由河南农业大学真菌研究室保藏并提供。

1.1.2 培养基 GYE(glucose yeast extract)培养基:酵母提取物5g、葡萄糖20g、维生素B1 0.01g、KH₂PO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.5g, ddH₂O溶解并定容至1L; 121℃下高压蒸汽灭菌30min。MCM培养基:微晶纤维素10g、MgSO₄·7H₂O 0.5g、(NH₄)₂HPO₄ 5g、KH₂PO₄ 4.6g、微量元素2mL(配方见表1), ddH₂O溶解并定容至1L, 121℃下灭菌30min。SA培养基:蔗糖20g、NH₄H₂PO₄ 2g、天冬酰胺(Asn) 0.88g、缬氨酸(L-Val) 1g、K₂HPO₄·3H₂O 0.224g、KH₂PO₄ 0.803g、MgSO₄·7H₂O 0.99g、CaCl₂

0.02 g, ddH₂O 溶解并定容至 1 L, 121 °C 下高压蒸汽灭菌 30 min。灭菌后加入 5 mL 微量元素溶液 I 和微量元素溶液 II。微量溶液 I: ZnSO₄·7H₂O 0.89 g、MnSO₄·H₂O 0.765 g、CuSO₄·5H₂O 0.20 g, ddH₂O 溶解并定容至 1 L, 使用 0.22 μm 细菌过滤器过滤除菌。微量元素 II: 腺苷 1.65 g、硫胺素盐酸盐 0.02 g, ddH₂O 溶解并定容至 1 L, 使用 0.22 μm 细菌过滤器过滤除菌。

表 1 微量元素配方
Table 1 Trace element formulation

试剂名称 Reagent name	添加量 Additive amount
柠檬酸 Citric acid	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	1 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25 g
MnSO ₄	50 mg
H ₃ BO ₃	50 mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	50 mg
ddH ₂ O	补足至 100 mL Add to 100 mL

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 在超净工作台中, 将冰箱保藏的 X831 菌种用无菌接种针取适量置于新鲜的 GYE 平板上, 25 °C 恒温避光培养箱培养 8~10 d。

1.2.2 平板菌丝培养 平板培养模拟糙皮侧耳出菇过程, 将 X831 菌种转接于 SA 固体培养基中, 置于 25 °C 黑暗环境中培养 7 d 至菌丝满板(CK), 收集部分样品备用; 随后将剩余平板转移至 16 °C 恒温培养箱(12 h 光照、12 h 黑暗)进行出菇管理, 培养 5 d 和 10 d 后分别收集样品备用; 培养约 15 d 左右时, 收集原基期样品; 待长出平菇子实体(培养约 22 d)后, 收集子实体样品, 置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 液体菌丝培养 将 8~10 块活化的平菇 X831 菌种块转接至新鲜的 GYE 液体培养基中(其中放入 8~10 颗玻璃珠用来打碎菌丝), 在 25 °C、180 r·min⁻¹ 下培养 6~7 d, 菌液呈现均匀的小米粥状, 用磁力搅拌器搅拌 30 min 左右, 进一步使菌丝均匀化, 确保每瓶的接种量相同, 然后以 5% 的接种量接到新鲜的 GYE 培养基中, 在 25 °C、180 r·min⁻¹ 下培养 5 d, 以葡萄糖为唯一碳源的处理组继续用 GYE 液体培养基培养 2 d(CK), 以纤维素为碳源的处理组需要把菌丝过滤出来, 在超净工作台中用无菌水把菌丝表面的培养基冲洗干净后转接入新的以纤维素为唯一碳源的 MCM 液体培养基中培养 2 d。结束后用漏勺过滤掉培养基, 把过滤得到的菌丝表

面的培养基用去离子水冲洗干净, 然后用无纺布吸走菌丝表面的水分, 锡纸包裹后液氮冷冻处理, 然后将收集到的不同处理的菌丝放置 -80 °C 冰箱保存。

1.2.4 非生物胁迫处理 温度胁迫: 将活化好的 X831 菌种转接 GYE 平板, 待长至平板的 2/3 时, 分别在 42 °C、4 °C 培养箱胁迫培养 24 h, 以 25 °C 为对照(CK), 刮取菌丝后, 液氮速冻, 样品置于 -80 °C 保存备用。氧化胁迫: 将 X831 菌种转接在 2 mmol·L⁻¹ 过氧化氢的 GYE 平板上, 添加等体积去离子水作为空白对照, 25 °C 恒温避光培养箱培养 8~10 d。刮取菌丝后, 液氮速冻, 样品置于 -80 °C 冰箱保存备用。重金属胁迫: 将 X831 菌种接种至 0、5、10、15 mg·L⁻¹ 的硝酸铅、氯化镉和氯化汞的 GYE 培养基, 添加等体积去离子水作为对照组, 25 °C 恒温黑暗培养至对照菌丝满板, -80 °C 冰箱保存备用。盐胁迫处理: 将 X831 菌种接种至含有 1%、2% NaCl 的 GYE 培养基, 以 0% NaCl 的 GYE 培养基为对照组, 放入 25 °C 恒温培养箱培养 8~10 d, 刮取菌丝后, 液氮速冻, 样品置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2.5 RNA 提取及荧光定量 PCR 分析 将 -80 °C 冰箱保存的样品置于研钵中, 液氮研磨至粉末状, 然后使用南京诺维赞 FreeZol Reagent 试剂盒进行 RNA 提取。用分光光度计测定 RNA 浓度, 反转录使用南京诺唯赞 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 反转录试剂盒。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL, qPCR 程序设定为 95 °C, 30 s(保持阶段); 95 °C, 10 s; 60 °C, 30 s(循环阶段, 40 个循环)。荧光定量所用 PCR 引物如表 2。

表 2 荧光定量 PCR 引物

Table 2 Primers used for fluorescence quantitative PCR

引物 Primer	序列 Sequence
<i>β</i> actin-F	CGACCCATCCTACGAGC
<i>β</i> actin-R	TAGGCTGCGTCACTTGC
<i>AMPKα</i> -F	TCCTTTCTTACCACCGAGC
<i>AMPKα</i> -R	TGGGAGGAGATACCAGCGAA
<i>AMPKβ</i> -F	TACAAAATGCAGGCAGGACC
<i>AMPKβ</i> -R	AATATTGGGTGCTGCGATAA
<i>AMPKγ</i> -F	TCACGCAATATCGCCTCCTC
<i>AMPKγ</i> -R	GTGGCGATAGGGTGGTATGG

1.3 数据分析

采用 GraphPad Prism 9.0 对荧光定量数据进行可视化分析及统计学处理。试验组与对照组间差异显著性通过单因素方差分析(One-way ANOVA)判定。

2 结果与分析

2.1 AMPK 3个亚基的鉴定

经过同源序列(BLASTP)比对,在糙皮侧耳数

据库(https://mycocosm.jgi.doe.gov/pages/blast-query.jsfdb=PleosPC15_1)中获得1个灵芝SNF1同源蛋白AMPK α ,获得酿酒酵母 β 亚基和 γ 亚基同源蛋白AMPK β 和AMPK γ 各1个,结果如图1所示。

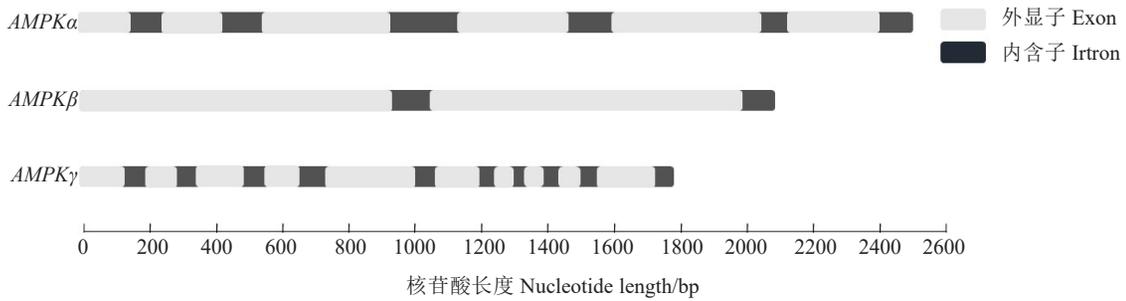


图1 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 基因结构

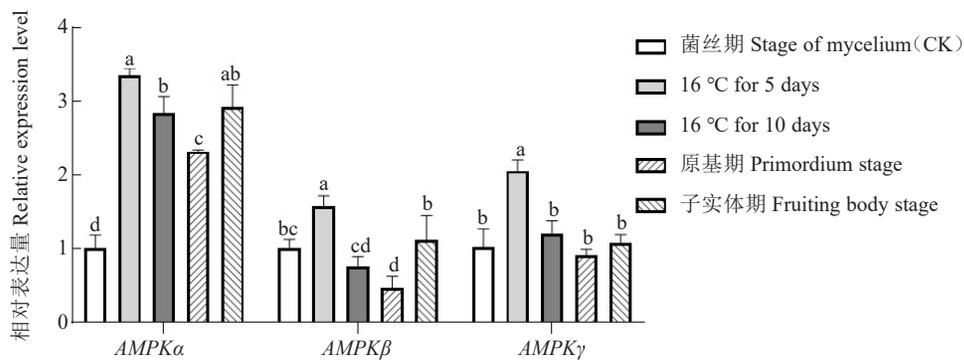
Fig. 1 Gene structure of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ

2.2 AMPK 3个亚基在不同生长发育时期相对表达量的变化

为了探究AMPK 3个亚基在糙皮侧耳不同生长发育时期的表达情况,笔者用平板培养模拟糙皮侧耳出菇培养条件,qPCR检测在不同发育时期内(菌丝期、16℃诱导出菇5d、16℃诱导出菇10d、原基期、子实体期)3个亚基表达量,结果如图2所示,AMPK α 亚基的相对表达量在低温诱导前期、原基期和子实体期都较对照组菌丝期升高了2倍以上,AMPK α 亚基在子实体形成期大量合成,参与了糙皮侧耳子实体形成的整个阶段。AMPK β 亚基和AMPK γ 亚基在模拟子实体形成的低温诱导前期表达量显著上升,但是幅度不大,除AMPK β 亚基在原基期的相对表达量显著降低外,AMPK β 亚基和AMPK γ 亚基其他时期的表达量与菌丝期相比均无明显变化,说明AMPK β 和 γ 亚基可能参与糙皮侧耳子实体的形成。

2.3 AMPK 3个亚基在营养胁迫下相对表达量的变化

作为碳代谢调控关键元件,AMPK的基本功能就是在营养胁迫条件下调控能量代谢。为了探究AMPK 3个亚基在糙皮侧耳不同营养条件下的响应情况,笔者以非优势碳源微晶纤维素替代优势碳源葡萄糖,检测在营养胁迫下3个亚基的表达量,结果如图3所示。与以葡萄糖为唯一碳源相比,除 β 亚基显著上调表达外, α 亚基和 γ 亚基表达水平并无明显变化,文献报道,碳饥饿会导致AMPK α 催化亚基磷酸化水平显著增加,进而激活蛋白激酶酶活性来响应碳饥饿造成的代谢失衡^[12]。结合本试验结果与文献报道可推测:在当前的营养胁迫(微晶纤维素替代葡萄糖)条件下, α 亚基和 γ 亚基的转录水平未发生显著变化,但 α 亚基可能通过文献报道的磷酸化修饰途径被激活;而 β 亚基则主要在转录水



注:不同小写字母表示处理间在0.05水平差异显著。下同。

Note: Different small letters indicate significant difference among different treatments at 0.05 level. The same below.

图2 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 在不同生长发育时期相对表达量变化

Fig. 2 Relative expression level of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ at different growth and development stages

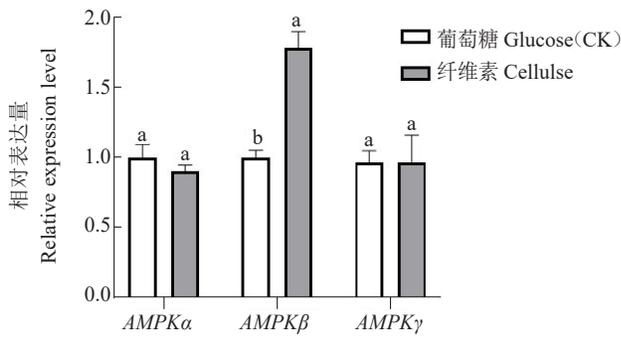


图3 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 在营养胁迫下相对表达量的变化

Fig. 3 Changes in relative expression levels of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ under nutritional stress

平上受到调控。这表明 AMPK 不同亚基响应营养胁迫可能存在差异化的调控机制。

2.4 AMPK 3个亚基在温度胁迫下相对表达量的变化

探究 AMPK 蛋白激酶 3 个亚基在冷热胁迫下的表达特性,结果如图 4 所示,AMPK α 基因在冷热胁迫下表达水平均显著升高,AMPK β 亚基在温度胁迫下表达量均无明显变化,AMPK γ 亚基在冷胁迫下表达水平无明显变化,在热胁迫下显著上调表达。上述结果表明,AMPK α 亚基和 AMPK γ 亚基响应热胁迫的诱导转录水平升高,可能参与调控热胁迫途径缓解糙皮侧耳热损伤,AMPK α 亚基还受冷胁迫诱导表达量升高,响应低温胁迫。AMPK β 亚基不受温度胁迫响应,不参与调控温度胁迫。

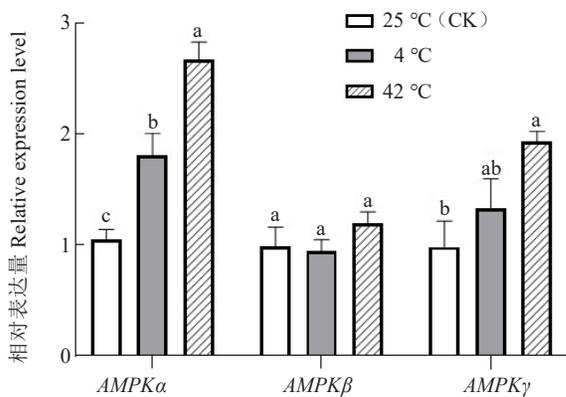


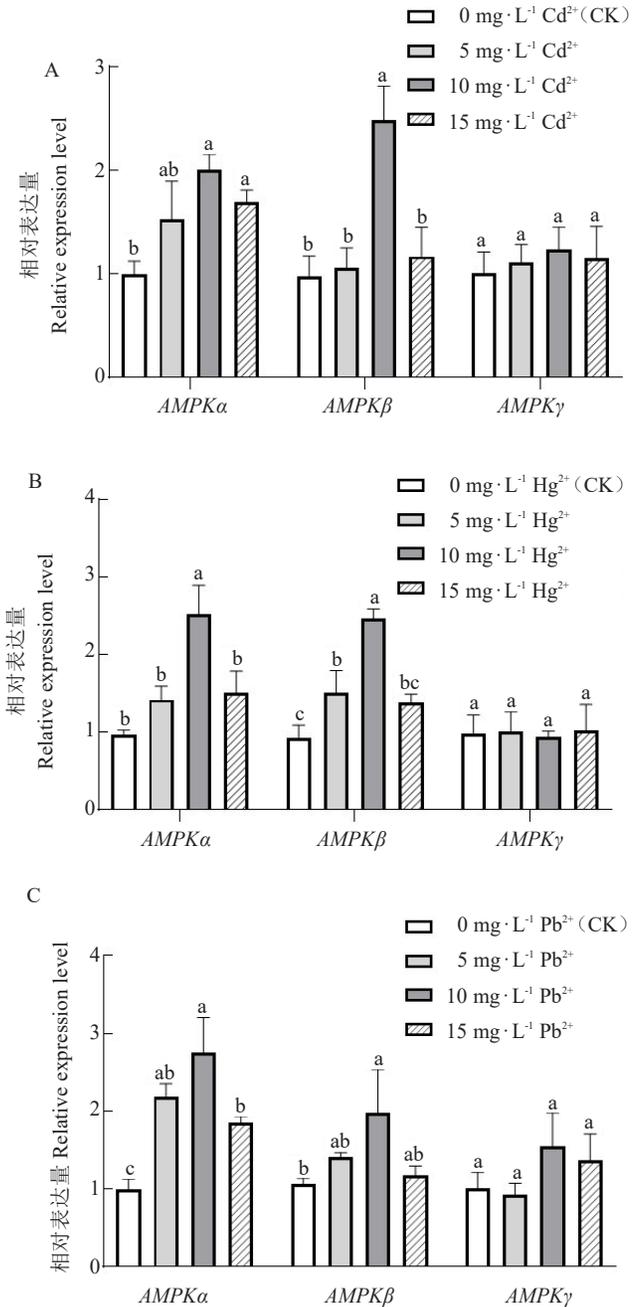
图4 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 在温度胁迫下相对表达量的变化

Fig. 4 Changes in relative expression levels of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ under temperature stress

2.5 AMPK 3个亚基在重金属胁迫下相对表达量的变化

为了明确 AMPK 3 个亚基是否响应重金属胁迫,通过平板外源添加不同质量浓度的镉(Cd)、汞(Hg)、铅(Pb),探究 α 、 β 、 γ 3 个亚基的表达特性,结果如图 5 所示。AMPK α 和 AMPK β 亚基表达量在

胁迫,通过平板外源添加不同质量浓度的镉(Cd)、汞(Hg)、铅(Pb),探究 α 、 β 、 γ 3 个亚基的表达特性,结果如图 5 所示。AMPK α 和 AMPK β 亚基表达量在



注:A. Cd²⁺处理下 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 的表达水平; B. Hg²⁺处理下 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 的表达水平; C. Pb²⁺处理下 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 的表达水平。

Note: A. The expression levels of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ under Cd²⁺ treatment; B. The expression levels of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ under Hg²⁺ treatment; C. The expression levels of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ under Pb²⁺ treatment.

图5 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 在重金属胁迫下相对表达量的变化

Fig. 5 Changes in relative expression levels of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ under heavy metal stress

10 mg·L⁻¹ Cd²⁺、10 mg·L⁻¹ Hg²⁺和 10 mg·L⁻¹ Pb²⁺处理下均显著升高,约为对照组的 2 倍,AMPK γ 亚基表达量在 3 种重金属胁迫处理下均无显著变化。以上结果表明,AMPK α 和 AMPK β 亚基响应 10 mg·L⁻¹ 处理的 Cd²⁺、Hg²⁺、Pb²⁺胁迫,AMPK γ 亚基不响应重金属胁迫。

2.6 AMPK 3 个亚基在氧化胁迫下相对表达量的变化

通过外源添加过氧化氢,模拟氧化胁迫条件,探究 AMPK 3 个亚基对氧化胁迫的响应情况,结果如图 6 所示。AMPK α 亚基的表达量在 2 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理下显著提高,AMPK β 和 AMPK γ 的表达量相较于对照组无显著变化,由此可知,仅 AMPK α 亚基在转录水平响应氧化胁迫。

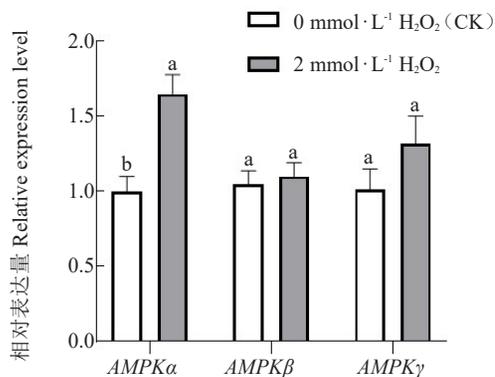


图 6 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 在氧化胁迫下相对表达量的变化

Fig. 6 Changes in relative expression levels of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ under oxidative stress

2.7 AMPK 3 个亚基在盐胁迫下相对表达量的变化

通过外源添加不同浓度 NaCl,模拟盐胁迫条件,探究 3 个亚基对盐胁迫响应情况,结果如图 7

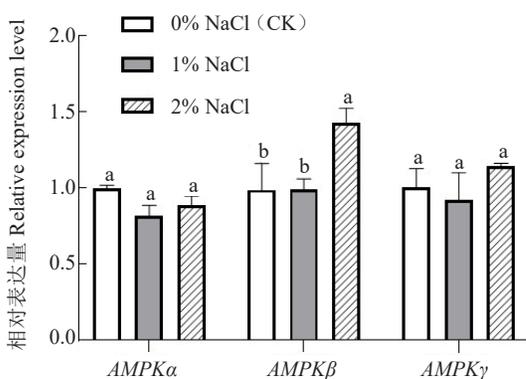


图 7 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 在盐胁迫下相对表达量的变化

Fig. 7 Changes in relative expression levels of AMPK α , AMPK β , and AMPK γ under salt stress

所示,AMPK β 亚基在 2% NaCl 处理下表达量显著上调,AMPK α 和 AMPK γ 亚基的表达水平无显著变化,仅 AMPK β 亚基响应 2% NaCl 处理的盐胁迫诱导。

3 讨论与结论

生物体在生长和发育过程中会遭遇外界环境的多种刺激,在多种应激条件下胞内代谢失衡,维持能量稳态是生物体生存的一个重要策略,AMPK 蛋白激酶可以在多种信号通路中调控能量代谢,从而响应逆境胁迫^[19]。糙皮侧耳是我国主栽食用菌种类之一,生长发育受外界环境影响较大。外界胁迫不仅会阻碍菌丝生长,还会促使大量活性氧(ROS)积累,破坏细胞内氧化还原稳态,进而导致细胞内能量代谢失衡^[20]。

笔者在本研究发现,AMPK 复合体的 α 、 β 、 γ 亚基在糙皮侧耳应对非生物胁迫时呈现显著差异表达的特征。 α 亚基作为催化核心,在温度胁迫、重金属胁迫及氧化胁迫中均表现显著上调,且贯穿子实体发育全程,提示其可能通过维持基础能量代谢参与发育调控。而 β 、 γ 亚基则表现出胁迫特异性: β 亚基在重金属暴露及营养胁迫时激活, γ 亚基则特异性响应热激。值得注意的是,三者相同胁迫下缺乏表达同步性,暗示亚基可能存在独立于经典三聚体复合物的调控路径。这一现象在进化保守性研究中获得佐证,番茄中编码 α 亚基的基因 *PpSnRK1 α* 可以提高抗氧化酶基因的表达水平和酶活性,调节活性氧代谢进而增强耐盐性,也可以和 ShCIGT 蛋白质互作来改善番茄的耐寒和耐旱性^[21-22]。黄曲霉菌 AMPK β 亚基 GAL83 可以和 Fus3 相互作用调节黄曲霉菌的次生代谢产物^[23]。AMPK 的 3 个亚基可以和多种与其激酶活性无关的蛋白质相互作用响应逆境胁迫,具有独立于三聚体复合物之外的激酶活性,由此通过 3 个亚基在相同的非生物胁迫下的不同表达模式,也可猜测 3 个亚基在不同的非生物胁迫下可能独立于三聚体复合物发挥调控功能。

敲除小鼠中的 AMPK α 亚基会加剧镉胁迫造成的氧化损伤,AMPK 通路还可以减轻兔子大脑中镉诱导的氧化应激和自噬^[21-22]。在本研究中,AMPK α 和 AMPK β 在重金属镉、汞和铅诱导下,转录水平均升高,暗示 AMPK α 和 AMPK β 可能在糙皮侧耳抵抗重金属胁迫中发挥一定作用。在糙皮侧耳遭遇由微晶纤维素替代葡萄糖引发的营养胁迫时,AMPK β 亚基的转录水平显著升高,而 α 和 γ 亚基的

转录水平则未发生显著变化。笔者推测糙皮侧耳在应对此类急性能量危机时, β 亚基在转录水平的上调可能反映了其调控的重要性或长期适应需求,糙皮侧耳可能通过 α 亚基的变构调节(而非转录激活)响应能量危机^[12]。这种多层次(转录与翻译后)、多亚基(β 与 α)的协同调控策略,使AMPK能够灵活高效地应对急性营养胁迫。

综上所述,AMPK α 在子实体发育全过程及温度胁迫、重金属胁迫和氧化胁迫中均呈显著上调表达,表明其可能通过基础能量代谢调控参与生长发育与胁迫应答。 β 和 γ 亚基表现出明显的胁迫特异性: β 亚基特异性响应重金属及营养胁迫,而 γ 亚基仅在热激条件下显著激活。3个亚基在相同胁迫处理下呈现异步表达特征,且 β/γ 亚基在模拟子实体发育阶段未检测到显著转录波动,提示各亚基可能通过独立于经典三聚体复合物的非典型通路发挥调控功能。

参考文献

- [1] 董浩然,于海龙,姜宁,等.中国食用菌工厂化生产发展现状及趋势[J].食药用菌,2024,32(1):1-9.
- [2] 曹月刚,赵健,韩吉辉.食用菌营养价值及产品开发现状分析[J].中国食品工业,2024(1):165-167.
- [3] 唐廷廷,聂青玉,陈吉裕,等.现代农业发展背景下中国平菇产业现状及对策研究[J].中国瓜菜,2025,38(2):184-194.
- [4] 李虎,颜廷武,吴志旻.大食物观下食用菌产业链韧性面临的现实挑战与提升对策[J].食药用菌,2024,32(5):281-288.
- [5] 常婷婷,赵妍,杨焕玲,等.食药用菌高温胁迫应答研究进展[J].食用菌学报,2021,28(1):124-134.
- [6] BHUTTA M S, GALLO E S, BORENSTEIN R. Multifaceted role of ampk in viral infections[J]. Cells, 2021, 10(5): 1118.
- [7] STEINBERG G R, HARDIE D G. New insights into activation and function of the AMPK[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2023, 24: 255-272.
- [8] MENG L, LIU H L, LIN X, et al. Enhanced multi-stress tolerance and glucose utilization of *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the *SNF1* gene and varied beta isoform of Snf1 dominates in stresses[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 134.
- [9] YAN Y, ZHOU X E, XU H E, et al. Structure and physiological regulation of AMPK[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(11): 3534.
- [10] EMANUELLE S, HOSSAIN M I, MOLLER I E, et al. SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK[J]. Plant Journal, 2015, 82(2): 183-92.
- [11] KUMAR P, MADHAWAN A, SHARMA A, et al. A sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 1 gene from wheat, *TaSnRK1a* regulates starch biosynthesis by modulating AGPase activity[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 207: 108407.
- [12] HU Y R, XU W Z, HU S, et al. Glnsfl-mediated metabolic rearrangement participates in coping with heat stress and influencing secondary metabolism in *Ganoderma lucidum*[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2020, 147: 220-230.
- [13] WILLOWS R, NAVARATNAM N, LIMA A, et al. Effect of different γ -subunit isoforms on the regulation of AMPK[J]. Biochemical Journal, 2017, 474(10): 1741-1754.
- [14] CHANDRASHEKARAPPA D G, MCCARTNEY R R, O'DONNELL A F, et al. The β subunit of yeast AMP-activated protein kinase directs substrate specificity in response to alkaline stress[J]. Cellular Signalling, 2016, 28(12): 1881-1893.
- [15] SHYMANSKY C M, WANG G, BAIDOO E E K, et al. Flux-enabled exploration of the role of Sip1 in galactose yeast metabolism[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2017, 5: 31.
- [16] ZHOU Q, HAO B, CAO X, et al. Energy sensor AMPK gamma regulates translation via phosphatase PPP6C independent of AMPK alpha[J]. Molecular Cell, 2024, 84(9): 1816-1816.
- [17] KE C L, LEW S Q, HSIEH Y, et al. Convergent and divergent roles of the glucose-responsive kinase SNF4 in *Candida tropicalis*[J]. Virulence, 2023, 14(1): 2175914.
- [18] MARTÍNEZ- BARAJAS E, COELLO P. Review: How do SnRK1 protein kinases truly work? [J]. Plant Science, 2020, 291: 110330.
- [19] LING N X Y, KACZMAREK A, HOQUE A, et al. mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress[J]. Nature Metabolism, 2020, 2(1): 41-49.
- [20] QIU ZH, WU XL, GAO W, et al. High temperature induced disruption of the cell wall integrity and structure in *Pleurotus ostreatus* mycelia[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(15): 6627-6636.
- [21] WANG W R, LING J H, WANG G F, et al. Overexpression of *PpSnRK1a* in tomato enhanced salt tolerance by regulating ABA signaling pathway and reactive oxygen metabolism[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 128.
- [22] YU C Y, SONG L L, SONG J W, et al. *ShCIGT*, a trihelix family gene, mediates cold and drought tolerance by interacting with *SnRK1* in tomato[J]. Plant Science, 2018, 270: 140-149.
- [23] MA L X, MA J N, TIAN Y Y, et al. Fus3 interacts with Gal83, revealing the MAPK crosstalk to Snf1/AMPK to regulate secondary metabolic substrates in *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(17), 10065-10075.
- [24] LI R Y, LUO X, ZHU Y J, et al. ATM signals to AMPK to promote autophagy and positively regulate DNA damage in response to cadmium-induced ROS in mouse spermatocytes[J]. Environmental Pollution, 2017, 231(2): 1560-1568.
- [25] XUE H T, CAO H B, XING C H, et al. Selenium triggers Nrf2-AMPK crosstalk to alleviate cadmium-induced autophagy in rabbit cerebrum[J]. Toxicology, 2021, 459: 152855.