

基于转录组测序的香菇耐热相关 调控基因的筛选与分析

赵新平,刘金玲,王昱峰,李栋栋,丁 亮,闻亚美,刘 芹,孔维丽

(河南省农业科学院食用菌研究所 郑州 450002)

摘 要:为探索香菇响应热胁迫的关键基因,以耐热菌株香 931 和热敏菌株农科 1 号为材料,以 36 °C 高温培养为处理,以 25 °C 正常温度培养为对照(CK),进行转录组测序分析。结果表明,与 CK 相比,香 931 和农科 1 号经高温处理后的菌丝生长速度显著降低,香 931 和农科 1 号对高温反应特有的差异基因分别为 740 个和 702 个。对差异表达基因进行 KEGG、GO 富集分析,香 931 和农科 1 号差异表达基因均主要显著富集在与代谢有关的功能通路和过程中,但二者在富集的数量上存在差异。结合 KOG 注释和相关数据库分析,漆酶基因以及 HSP20 家族基因在不同处理之间表达差异显著,推测其为香菇耐热相关的调控基因。随机挑选 6 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证,结果显示基因表达趋势与转录组测序数据一致。研究结果为香菇耐热性状的分子机制研究及耐热香菇新品种选育奠定了基础。

关键词:香菇;温度;菌丝生长;转录组;差异表达基因

中图分类号:S646.1² **文献标志码:**A **文章编号:**1673-2871(2025)10-018-11

Screening and analysis of genes related to heat resistance in *Lentinus edodes* based on transcriptome sequencing

ZHAO Xinping, LIU Jinling, WANG Yufeng, LI Dongdong, DING Liang, WEN Yamei, LIU Qin, KONG Weili

(Institute of Edible Fungi, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract: To explore key genes involved in *Lentinula edodes* (shiitake mushroom) response to heat stress, transcriptome sequencing analysis was performed using the heat-tolerant strain Xiang 931 and the heat-sensitive strain Nongke 1. Mycelia were subjected to high-temperature treatment at 36 °C, with normal temperature cultivation serving as the control (CK). The results showed that compared to the CK group, the mycelial growth rate of both Xiang 931 and Nongke 1 significantly decreased after high-temperature treatment. Strain-specific differentially expressed genes (DEGs) in response to high temperature were 740 for Xiang 931 and 702 for Nongke 1. KEGG and GO enrichment analysis of the DEGs revealed that genes from both strains were primarily and significantly enriched in metabolism-related functional pathways and processes, although the number of enriched genes differed between the two strains. Combined analysis based on KOG annotation and relevant databases indicated that laccase genes and HSP20 family genes exhibited significant expression differences between treatments, suggesting they are potential regulatory genes associated with heat tolerance in *L. edodes*. Six DEGs were randomly selected for qRT-PCR validation, and the results confirmed that the gene expression trends were consistent with the transcriptome sequencing data. This study provides a foundation for research into the molecular mechanisms of heat tolerance in *L. edodes* and the breeding of new heat-tolerant cultivars.

Key words: *Lentinus edodes*; Temperature; Mycelial growth; Transcriptome; Differential gene expression

香菇(*Lentinula edodes*)是一种腐生真菌,在韩国、日本和中国广泛种植,近年来其产量和使用量不断增加^[1-2],在世界范围内作为食品和药用成分广

泛使用^[3]。香菇营养丰富,含有多种矿物质、维生素和生物活性化合物,可以促进身体健康和预防疾病发生^[4-5]。

收稿日期:2025-03-10;修回日期:2025-05-27

基金项目:河南省现代农业产业技术体系专项资金资助项目(HARS-22-08-S);河南省农业科学院自主创新项目(2025ZC91)

作者简介:赵新平,男,研究实习员,主要从事食用菌遗传育种工作。E-mail:zxinping1014@163.com

通信作者:孔维丽,女,研究员,主要从事食用菌育种及平菇发酵料栽培机制研究。E-mail:kongweili2005@126.com

温度是影响香菇生长发育的重要环境因子之一。在培养过程中,高温胁迫会影响香菇菌丝的生长,甚至引起菌丝的凋亡和腐烂,造成严重的经济损失^[6]。总体而言,香菇属中低温菌株,最适温度范围为24~27℃^[7]。夏季高温天气对香菇的品质和产量产生不利影响^[8],从而制约其产业的发展。高温环境导致香菇菌丝活性降低^[9],30℃的菌丝生长速率只有25℃的一半或三分之一。高温也会导致木霉菌侵染香菇菌丝^[10-11]。此外,子实体的农艺性状也受到影响,表现为蘑菇体积较小,质地松软,容易开伞^[12]。刘萌等^[13]研究表明,与25℃常温培养相比,37℃高温胁迫后香菇菌丝的干质量、生长速率明显降低。因此,提高香菇菌丝耐热性,筛选香菇耐热基因对香菇新品种选育具有重要意义。组学及多组学联合分析发现,*LetrpB*、*LeTam-1*和*LeYUCCA*基因参与香菇热胁迫应答反应^[14];辛苗苗^[15]在研究香菇疏水蛋白和热激蛋白的转录和功能时,通过基因表达量分析和异源表达,证明了Hyd1蛋白和Hsp60蛋白可以提高香菇的抗高温能力。

在生产过程中,笔者发现香菇在高温(36℃)条件下菌丝生长存在表观差异。基于此,以耐热型菌株(香931)和热敏感型菌株(农科1号)为供试材料,应用转录组测序技术,筛选菌丝在高温胁迫下的差异表达基因,并进行GO和KEGG分析,初步解析热胁迫对香菇菌丝生长的影响,并挖掘出相关基因,以期为促进香菇新品种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

香菇菌株香931(耐热型菌株)和农科1号(热敏感型菌株)由河南省食用菌种质资源库提供。

1.2 试验处理

试验于2024年9月至2025年1月在河南省农业科学院食用菌研究所进行。处理组(36℃、12h):将香931和农科1号接种在PDA平板上置于25℃培养箱中5d后划线,然后置于36℃培养箱中连续培养12h,再置于25℃培养箱中恢复培养9d。对照组(CK):将香931和农科1号接种在PDA平板上置于25℃培养箱中连续培养14d。

1.3 菌丝生长速度

测量胁迫后的菌丝直径,计算平均生长速度,

生长速度($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$)=菌丝直径(mm)/时间(d)。刮取处理组及对照组菌丝迅速置于液氮中冷冻,于-80℃冰箱保存备用。每一处理分别收集3个板子作为3次生物学重复,用于后续转录组测序。

1.4 转录组测序及分析

1.4.1 RNA提取、cDNA文库构建及测序 采用TRIzol试剂盒用于香菇菌丝总RNA的提取,经Qubit 4.0荧光计/MD酶标仪测量RNA浓度,应用Qsep400生物分析仪检测RNA完整性后,按照试剂盒说明书构建cDNA文库。Q-PCR方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 $>2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)后,采用Illumina平台进行测序。

1.4.2 测序数据及质量控制 经过原始数据过滤、测序错误率检查及GC含量分布检查,获得后续分析使用的Clean reads。利用HISAT2将Clean reads与参考基因组进行序列比对,获取在参考基因组上的位置信息,以及测序样品特有的序列特征信息。

1.4.3 差异表达基因分析 根据比对上基因组reads的位置信息,使用StringTie将reads组装成转录本。StringTie应用网络流算法和可选的从头组装(denovo)来拼接转录本。根据比对结果和基因在参考基因组上的位置信息,统计每个基因的reads数量。笔者采用FPKM作为衡量转录本或基因表达水平的指标。使用DESeq2进行样品组间的差异表达分析,差异基因的筛选条件为 $|\log_2\text{Fold Change}| \geq 1$,且错误发现率(FDR) <0.05 。

试验设计包括4个组别,每组包含3个生物学重复,分别为耐热型菌株对照组(HSck)、耐热型菌株高温36℃、12h处理组(HS12h)、热敏感型菌株对照组(RSck)、热敏感型菌株高温36℃、12h处理组(RS12h)。通过DESeq2对不同组别之间的样本进行比较,寻找差异表达基因,分别进行HS12h_vs_HSck、RS12h_vs_RSck两组差异分析,为了减少假阳性结果,笔者使用Benjamini-Hochberg方法对P值进行校正,从而获得FDR。对差异基因进行火山图、热图、Venn图等可视化展示。

1.4.4 差异基因功能注释和富集分析 Gene Ontology(GO, <http://geneontology.org>)是基因功能国际标准分类体系。Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG, <https://www.genome.jp/kegg>)是整合了基因组、生物学通路、疾病、药物、化学物质等信息的综合性数据库。利用R包‘clusterProfiler’进行GO和KEGG功能富集分析,探索关键基因参与的功能通路。

1.5 qRT-PCR验证

随机选取 6 个差异表达基因进行荧光定量 PCR 检测,用反转录试剂盒将提取的香菇总 RNA

反转录为 cDNA,以 *18 s* 为内参基因,通过 Becan Designer 8.0 设计引物(表 1),使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers for qPCR

基因 ID Gene ID	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
C8R40DRAFT_1037889	GGACCTCCATGAAGACAA	AGTCAGACGACCGTTATG
C8R40DRAFT_1047809	AACTCTATCTTCAACGAT	AACTCTGCTTCAATTATG
C8R40DRAFT_1054009	CTTGGTATCTCCGACAGT	ATATCTCCTGCGGTAATAGT
C8R40DRAFT_1054022	CTTGTAATGCTAATCTTG	AGAAGTCATAGTCTGTTA
C8R40DRAFT_1056440	ACTTATCGTTCCACTCTC	CTCGTTGTCCATGTAGAA
C8R40DRAFT_1070202	TGGTATCACAGTCATCTT	GGTATCATCGTCAACATC
<i>18 s</i>	GCCTGGAAGTTTGTACG	TCCGAAGAGCAGAATGAA

1.6 统计分析

采用 SPSS 26.0 软件中独立样本 *T* 检验的方法进行统计分析,利用 Graphpad Prism 8.0 软件绘图。

2 结果与分析

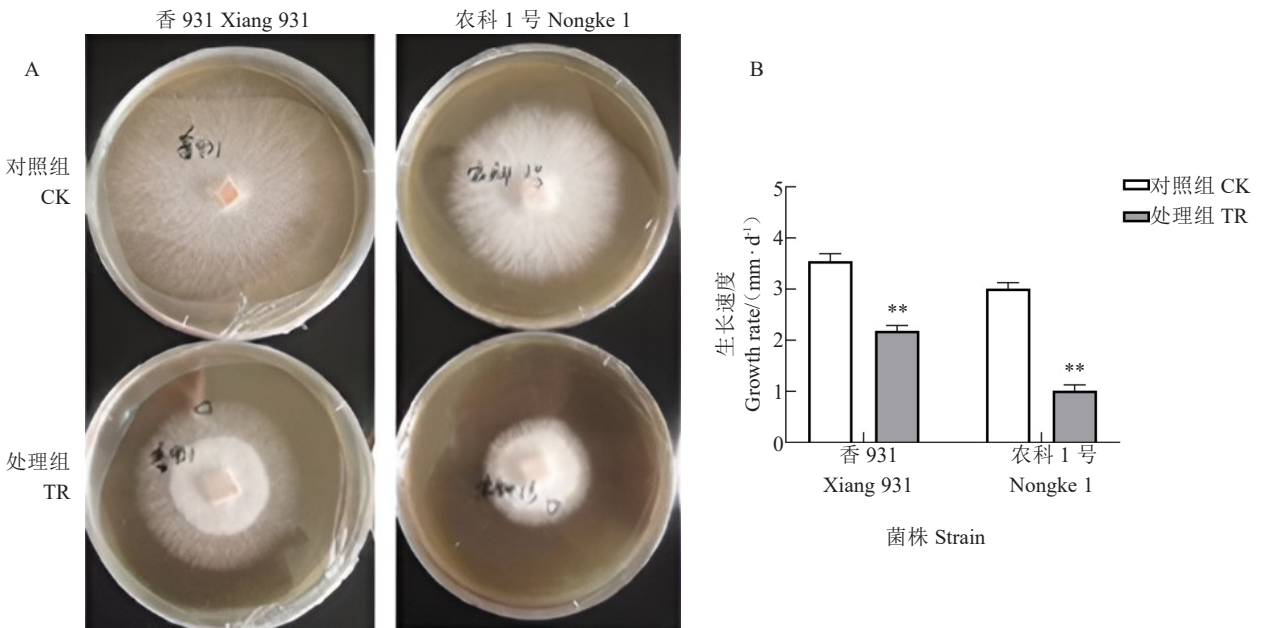
2.1 高温对香菇菌丝生长的影响

香 931 和农科 1 号菌丝在不同培养条件下的表型如图 1- A 所示,与对照组相比,处理组的香 931 和农科 1 号菌丝长度变短,菌丝生长量减少;且与耐热型菌株香 931 相比,热敏感型菌株农科 1 号

菌丝长度更短。此外,与对照组相比,香 931 和农科 1 号菌丝在高温胁迫下平均生长速度均极显著降低(图 1-B)。

2.2 差异表达基因分析

为了挖掘香 931 与农科 1 号的耐热相关基因,对转录组测序获得的差异表达基因进行筛选。结果表明,与 CK 相比,耐热型香菇菌株香 931 在高温 36 ℃处理 12 h 后,HS12h_vs_HSck 共检测出 1661 个差异表达基因,其中上调 742 个,下调 919 个;热敏感型香菇菌株农科 1 号在高温 36 ℃处理 12 h 后,



注: A. 不同处理条件下香菇菌丝的表型; B. 菌丝平均生长速度。 **表示在 0.01 水平差异极显著。
Note: A. Phenotype of *L. edodes* mycelia under different treatment conditions; B. Average mycelial growth rate. ** indicates extremely significant difference at 0.01 level.

图 1 高温对香菇菌丝生长的影响
Fig. 1 Effects of high temperature on the growth of *L. edodes* mycelia

RS12h_vs_RSck 共检测出 1623 个差异表达基因,其中上调 714 个,下调 909 个。香 931 和农科 1 号对高温反应特有的差异基因分别为 740 个和 702 个。在 2 个品种之间,RSck_vs_HSck 共检测出 166 个差异表达基因,其中上调 123 个,下调 43 个;RS12h_vs_HS12h 共检测出 196 个差异表达基因,其中上调 151 个,下调 45 个。

将差异表达基因构建韦恩图,由图 2 可知,4 个处理组共有的差异表达基因有 3 个,HS12h_vs_HSck 特有的差异表达基因有 667 个,RS12h_vs_RSck 特有的差异表达基因有 612 个,RS12h_vs_HS12h 特有的差异表达基因有 47 个,这 3 个比较组共有的差异表达基因为 20 个。

2.3 差异表达基因的 KEGG 富集分析

对 HS12h_vs_HSck 的差异表达基因进行 KEGG 富集分析,共识别出 120 条相关的代谢通路,选取了富集程度最高的前 20 条通路绘制散点图。由图 3 可以看出,在富集程度方面,核糖体通

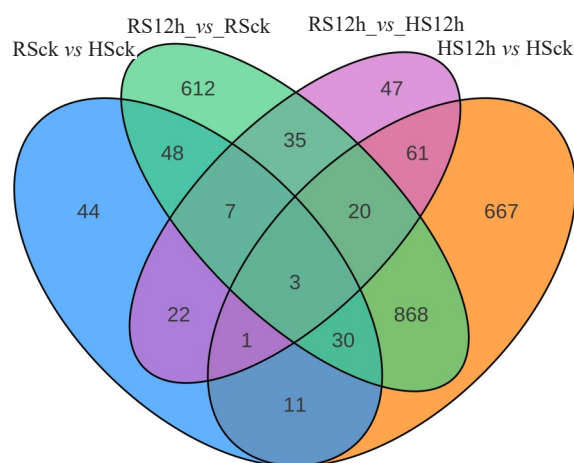


图 2 不同比较组差异表达基因维恩图

Fig. 2 Venn diagram of differentially expressed genes in different comparison groups

路、维生素 B6 代谢通路以及淀粉和蔗糖代谢通路的富集程度较高;在富集显著性方面,核糖体通路、淀粉和蔗糖代谢通路以及代谢途径通路显著性较

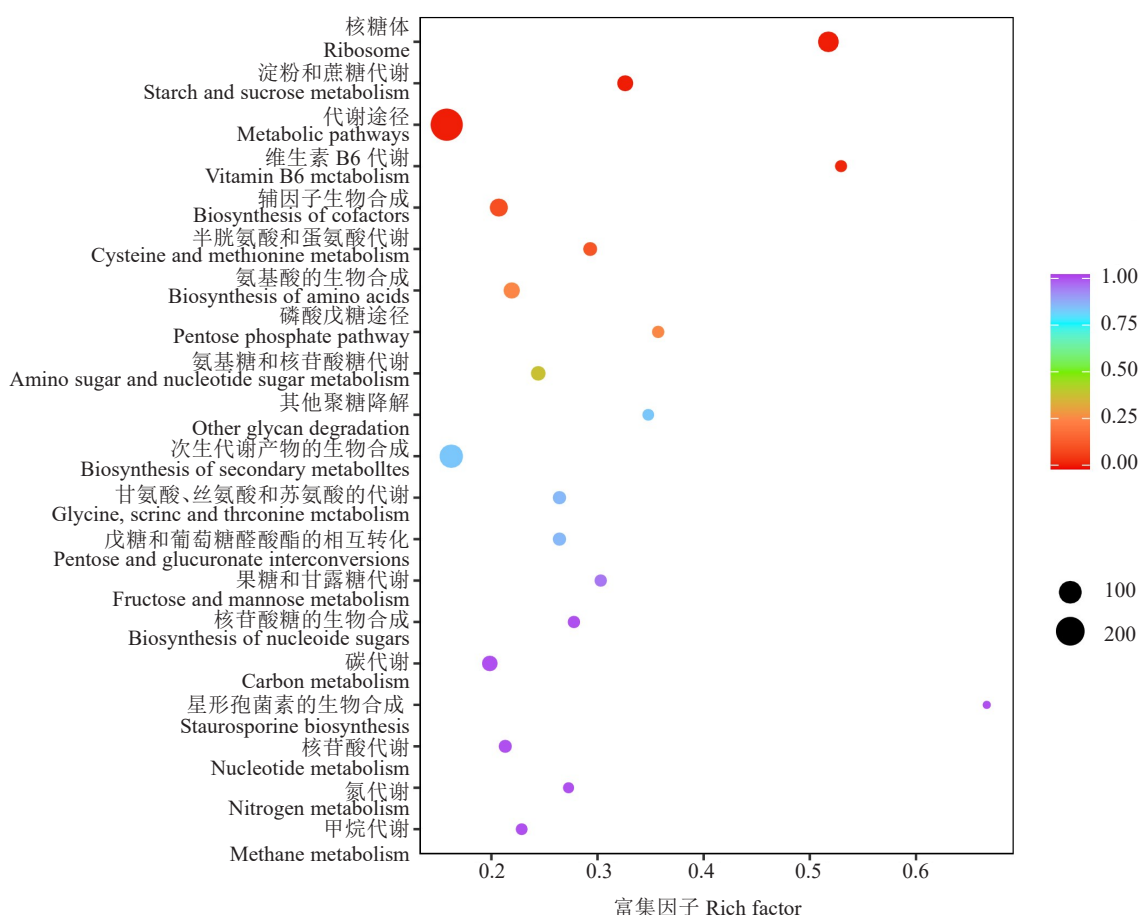


图 3 HS12h_vs_HSck 差异表达基因的 KEGG 通路

Fig. 3 The KEGG pathway of differentially expressed genes in HS12h_vs_HSck

高;在差异表达基因富集数量方面,代谢途径通路共富集 272 个差异表达基因,核糖体通路共富集 74 个差异表达基因,次生代谢产物的生物合成通路共富集 110 个差异表达基因。

对 RS12h_vs_RSck 的差异表达基因进行 KEGG 分析,选取富集程度最高的前 20 条通路绘制散点图。由图 4 可以看出,在富集程度方面,核糖体通路、氮代谢通路的富集程度较高;在富集显

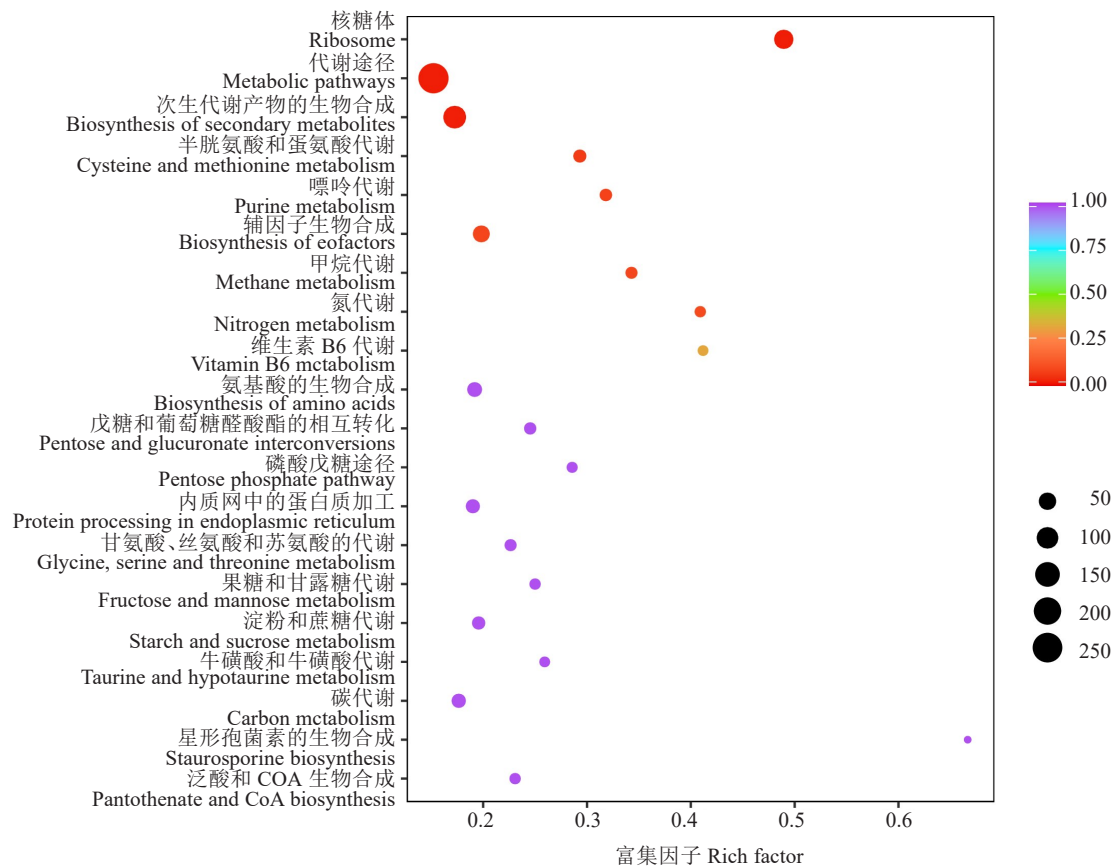


图 4 RS12h_vs_RSck 差异表达基因的 KEGG 通路

Fig. 4 The KEGG pathway of differentially expressed genes in RS12h_vs_RSck

著性方面,核糖体通路、次生代谢产物的生物合成通路、代谢途径通路以及维生素 B6 代谢通路的显著性较高;在差异表达基因富集数量方面,代谢途径通路共富集 262 个差异表达基因,核糖体通路共富集 70 个差异表达基因,次生代谢产物的生物合成通路共富集 117 个差异表达基因。

综上所述,不同耐热型品种的香菇菌株在响应热胁迫时,差异表达基因主要富集于代谢途径、辅因子生物合成、核糖体等信号通路,且差异表达基因多表现为下调,因此推测这些信号通路在香菇菌株应对热胁迫时具有重要作用。在两个比较组中,差异表达基因富集在次级代谢产物生物合成通路中的富集数量均较高,但是在显著性方面有较大差别。此外,在香 931 中,甲烷代谢与氮代谢信号通路富集程度与富集显著性均较低,而在农科 1 号中富集程度与显著性均大大增加。因此笔者推测 2 个品种耐热能力的差异可能是由这些信号通路调控形成的。

2.4 差异表达基因的 GO 富集分析

按照生物过程(biological process)、分子功能(molecular function)以及细胞组分(cellular component)三个大类分别对 2 个品种受热胁迫后的差异表达基因进行注释分析。按照注释上的基因数量从大到小进行排序,取三大类的前 15 个 GO Term(不足 15 个则全部展示),绘制 GO 分类柱状图。

由图 5 可以看出,2 个不同耐热型品种注释到生物过程大类的差异表达基因主要富集在代谢过程(metabolic process)、细胞过程(cellular process)、生物调控(biological regulation)、响应刺激(response to stimulus)和定位(localization),富集在生物过程大类的差异表达基因 GO 功能分类主要有碳水化合物代谢(GO:0005975)、肽代谢过程(GO:0043043)、酰胺生物合成(GO:0043604)等;注释到细胞组分大类的差异表达基因主要富集在细胞解

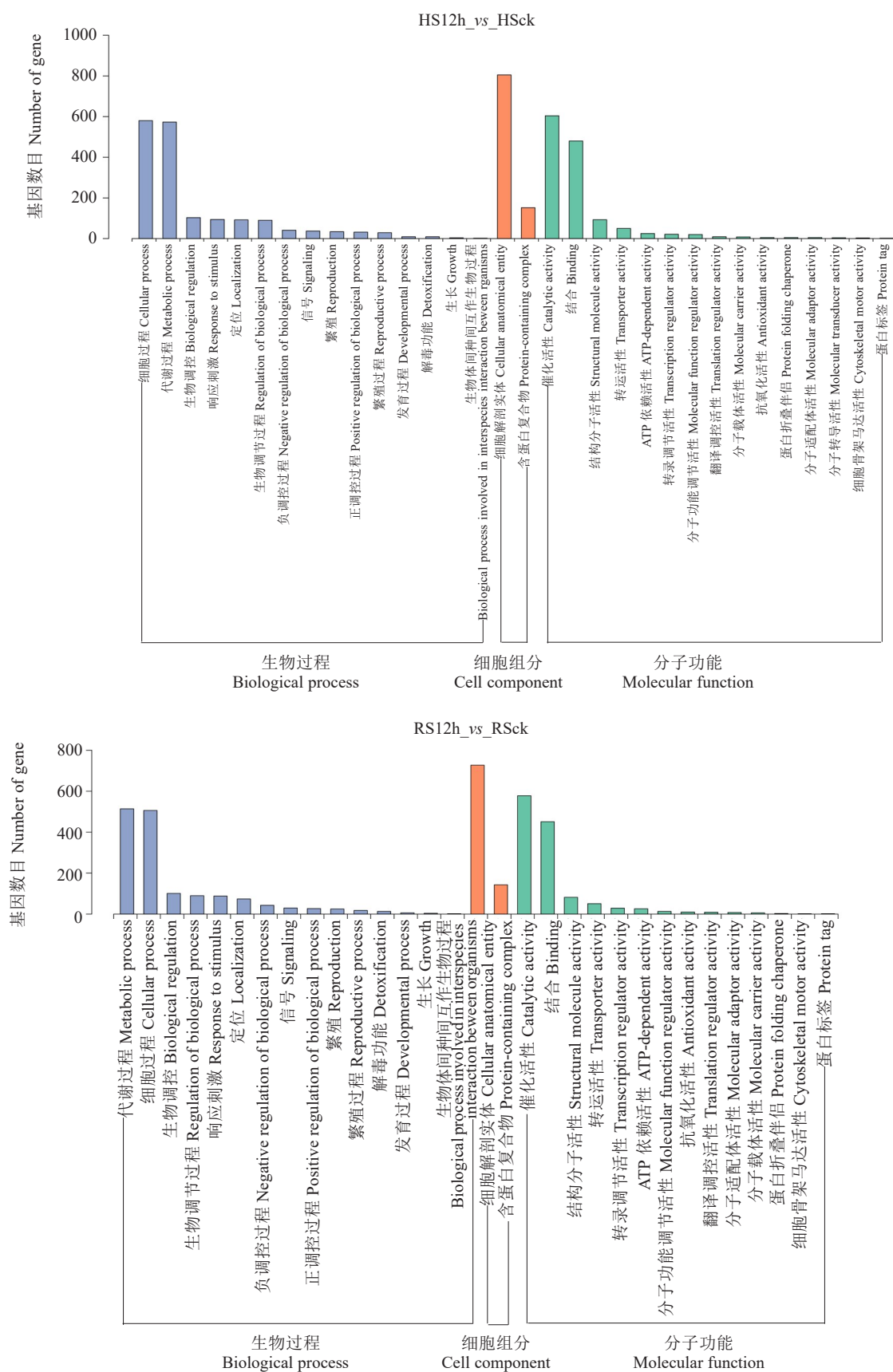


图5 差异表达基因的GO富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

剖实体 (cellular anatomical entity) 和含蛋白复合物 (protein-containing complex), 显著富集在细胞组分大类的差异基因 GO 功能分类主要有胞外组分 (GO:0005576)、核糖体 (GO:0005840) 等; 注释到分子功能大类的差异表达基因主要富集在催化活性 (catalytic activity) 和结合 (binding), 显著富集在分子功能大类的差异基因 GO 功能分类主要有结构分子活性 (GO:0005198)。因此推测这些生物过程在香菇应对热胁迫的调节过程中起重要作用。但是 2 个菌株在各个功能分类中注释到的基因数目存在较大差异, 并且在分子功能大类中, 耐热型菌株比较组的差异表达基因在水解酶生物过程中显著富集, 而热敏型菌株比较组则在核糖体结构成分生物过程中显著富集, 因此推测 2 个品种表现出不同耐热性状是由这些因素共同影响造成的。

2.5 差异表达基因的 KOG 注释分析

将 2 个比较组的差异表达基因分别对比到 KOG 数据库, 然后根据数据库蛋白 ID 提取相应的注释信息。依据 KOG 注释结果, 共分为 4 个大类: 细胞过程和信号转导、信息存储和处理、新陈代谢

以及特征不明确。由表 2 可知, HS12h_vs_HSck 比较组差异表达基因注释到细胞过程和信号转导大类的有 162 个, 注释到信息存储和处理大类的有 155 个, 注释到新陈代谢大类的有 243 个。由表 3 可知, RS12h_vs_RSck 比较组差异表达基因注释到细胞过程和信号转导大类的有 141 个, 注释到信息存储和处理大类的有 138 个, 注释到新陈代谢大类的有 250 个。根据结果可以看出, 差异表达基因均主要被注释到代谢相关大类, 因此代谢功能是香菇菌株应对热胁迫的主要调控手段。

2.6 香菇应对热胁迫的相关基因筛选与分析

根据转录组数据注释分析的结果, 对各个比较组共有和特有的差异表达基因进行筛选, 获得与热胁迫相关的基因为漆酶基因和热激蛋白基因。根据相关数据库注释, 漆酶基因注释为 *Laccase5* 基因, 热激蛋白基因注释为 6 个 HSP20 家族基因, 2 个 HSP90 家族基因, 3 个 HSP40 家族基因, 1 个 HSP70 家族基因。由表 4 可知, 受到热胁迫时, HSP20 家族基因在耐热型菌株香 931 和热敏型菌株农科 1 号中均上调表达, 但是在耐热型菌株中上调幅度显著大于热敏型菌株, 因此可能是 2 个品种

表 2 HS12h_vs_HSck 差异表达基因功能注释统计
Table 2 Differential gene function annotation statistics for HS12h_vs_HSck

分类 Category	功能分类的描述信息 Descriptive information for functional category	差异基因数目 Number of differential genes
细胞过程和信号转导 Cellular processes and signaling	细胞周期控制、细胞分裂、染色体分配 Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	12
	细胞壁/膜/包膜的生物形成 Cell wall/membrane/envelope biogenesis	4
	翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	61
	信号转导机制 Signal transduction mechanisms	43
	细胞内运输、分泌和囊泡运输 Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	14
	防御机制 Defense mechanisms	13
	胞外结构 Extracellular structures	1
	核结构 Nuclear structure	4
	细胞骨架 Cytoskeleton	10
信息存储和处理 Information storage and processing	RNA 加工与修饰 RNA processing and modification	12
	染色质结构与动态 Chromatin structure and dynamics	20
	翻译、核糖体结构和生物合成 Translation, ribosomal structure and biogenesis	91
	转录 Transcription	19
	复制、基因重组和修复 Replication, recombination and repair	13
新陈代谢 Metabolism	能源生产和转换 Energy production and conversion	37
	氨基酸转运和代谢 Amino acid transport and metabolism	30
	核苷酸转运和代谢 Nucleotide transport and metabolism	11
	碳水化合物的运输和代谢 Carbohydrate transport and metabolism	58
	辅酶的运输和代谢 Coenzyme transport and metabolism	13
	脂质运输和代谢 Lipid transport and metabolism	25
	无机离子传输和代谢 Inorganic ion transport and metabolism	9
	次级代谢物的生物合成、运输和分解 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	60

表 3 RS12h_vs_RSck 对照组差异基因功能注释统计
Table 3 Differential gene function annotation statistics for RS12h_vs_RSck

分类 Category	功能分类的描述信息 Descriptive information for functional category	差异基因数目 Number of differential genes
细胞过程和信号转导 Cellular processes and signaling	细胞周期控制、细胞分裂、染色体分配 Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	10
	细胞壁/膜/包膜的生物形成 Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3
	翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	57
	信号转导机制 Signal transduction mechanisms	28
	细胞内运输、分泌和囊泡运输 Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	17
	防御机制 Defense mechanisms	12
	胞外结构 Extracellular structures	1
	核结构 Nuclear structure	5
	细胞骨架 Cytoskeleton	8
信息存储和处理 Information storage and processing	RNA 加工与修饰 RNA processing and modification	16
	染色质结构与动态 Chromatin structure and dynamics	14
	翻译、核糖体结构和生物合成 Translation, ribosomal structure and biogenesis	84
	转录 Transcription	15
	复制、基因重组和修复 Replication, recombination and repair	9
新陈代谢 Metabolism	能源生产和转换 Energy production and conversion	42
	氨基酸转运和代谢 Amino acid transport and metabolism	34
	核苷酸转运和代谢 Nucleotide transport and metabolism	11
	碳水化合物运输和代谢 Carbohydrate transport and metabolism	46
	辅酶的运输和代谢 Coenzyme transport and metabolism	15
	脂质运输和代谢 Lipid transport and metabolism	32
	无机离子传输和代谢 Inorganic ion transport and metabolism	7
	次级代谢物的生物合成、运输和分解 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	63

表 4 HSP20 家族基因差异倍数统计
Table 4 Statistics of differential folds of HSP20 family genes

基因 ID Gene ID	差异倍数 Fold change(HS12h_vs_HSck)	差异倍数 Fold change(RS12h_vs_RSck)	差异倍数 Fold change(RS12h_vs_HS12h)
C8R40DRAFT_1041064	5.790	3.802	-1.116
C8R40DRAFT_1055484	6.040	3.911	-1.367
C8R40DRAFT_1159886	5.541	3.064	-1.178
C8R40DRAFT_1168918	6.116	4.871	-1.263
C8R40DRAFT_1175042	4.504	3.548	-0.653
C8R40DRAFT_392678	3.398	1.614	-1.382

间耐热能力形成差异的调控基因。在各个比较组中均差异表达的漆酶基因,也是导致 2 个品种耐热能力形成差异的调控基因。

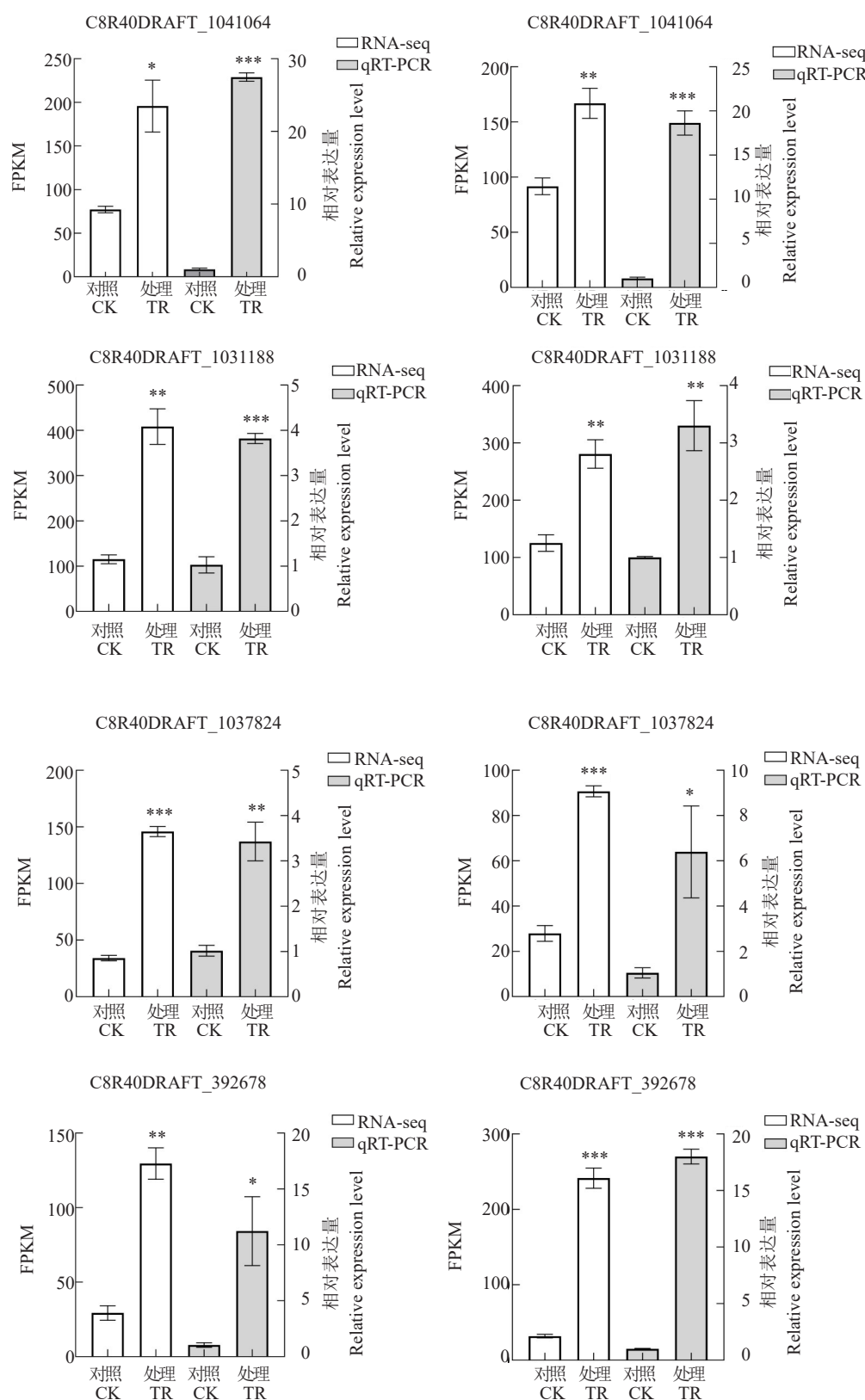
2.7 实时荧光定量 PCR 验证转录组测序结果

为了验证转录组数据的准确性,随机挑选了 6 个显著差异表达的基因,通过 qPCR 方法对基因表达量进行检测。由图 6 可以看出,验证的基因表达趋势与转录组测序趋势一致,说明转录组数据较为准确,可信度较高。

3 讨论与结论

香菇是栽培最广泛的食用菌之一,主要使用木屑培养基培养^[6]。在香菇的生长周期中,单核菌丝

成熟内部会产生隔膜,形成多细胞单核菌丝。两种携带不同遗传物质的单核菌丝经过物质交换、原生质融合等过程形成多细胞的双核菌丝,然后进行锁状联合。锁状联合后的双核菌丝在合适的条件下形成菌丝组织,从而形成子实体原基,进一步发育为菇蕾,最后发育成子实体^[17]。因此在香菇的生活史中,菌丝保持稳定的生理状态是十分重要的。影响菌丝生长和子实体发育的关键因素包括 pH、温度、湿度、光照和氧气^[18]。其中,温度是菌丝体生长的一个非常重要的环境因素^[9]。笔者在本研究中发现,香 931 和农科 1 号菌丝在 36℃、12 h 处理下生长速度均显著变慢;且与耐热型菌株香 931 相比,热敏感型菌株农科 1 号菌丝生长速度更慢。以上



注:*表示在 0.05 水平差异显著,**表示在 0.01 水平差异极显著,***表示在 0.001 水平差异极显著。左侧代表香 931,右侧代表农科 1 号。

Note: * indicates significant difference at 0.05 level, ** indicates extremely significant difference at 0.01 level, *** indicates extremely significant difference at 0.001 level. Left side represents Xiang 931, right side represents Nongke 1.

图 6 荧光定量 PCR 验证
Fig. 6 qRT-PCR verification

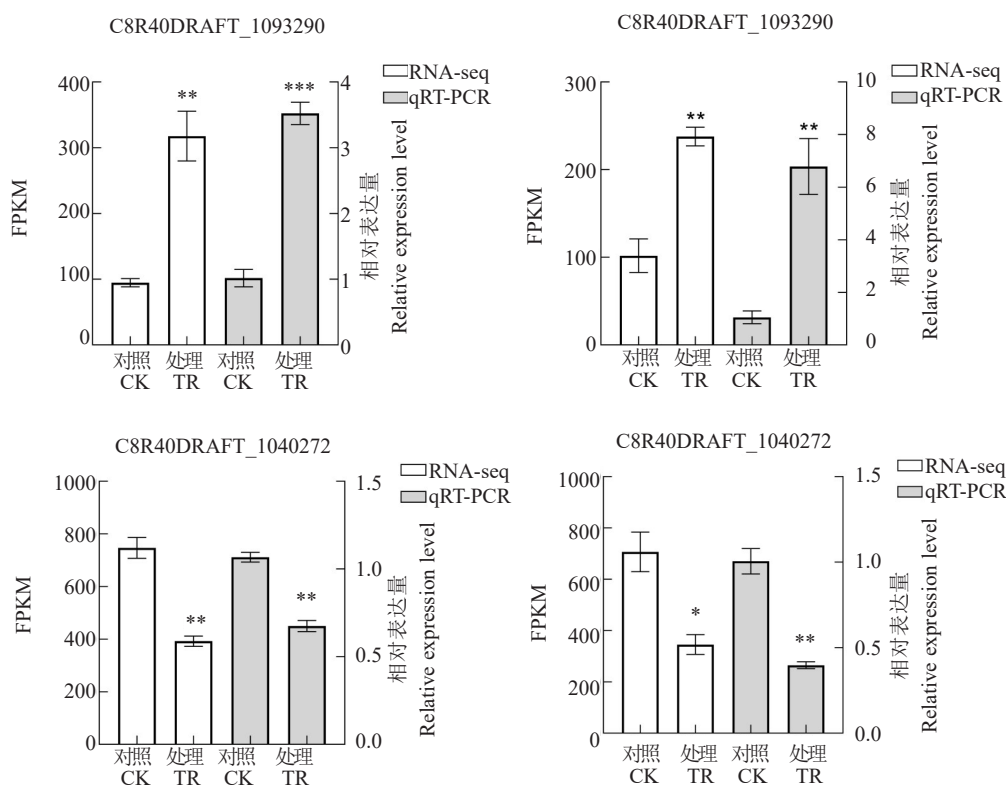


图6 (续)

Fig. 6 (Continued)

结果说明热胁迫对香菇菌丝体的生长会造成明显影响,并且对耐热性能差的香菇菌丝体影响更显著。

笔者通过转录组测序的方法,对差异表达基因进行 Venn 分析,得到香 931 对高温反应特有的差异表达基因 740 个,农科 1 号对高温反应特有的差异表达基因 702 个,4 个比较组共有的差异表达基因有 3 个。通过对差异表达基因的分析,深入挖掘调控香菇菌丝应对热胁迫的关键基因。漆酶属于多铜氧化酶(MCOs)超家族,这是一组由许多具有不同底物特异性和不同生物功能的蛋白质组成的酶^[20]。真菌漆酶参与木质纤维素聚合物的分解、防御/保护、毒力、发病机制、色素沉着和孢子形成过程^[21]。真菌漆酶的主要功能是木质纤维素的生物降解,从而对生物圈中的碳循环做出贡献^[22]。在本研究中,经数据库注释到 1 个漆酶基因 *Laccase5*,高温处理后,香 931 和农科 1 号的漆酶 *Laccase5* 基因表达量均显著降低,从而导致漆酶含量降低,阻碍了木质素分解,使香菇菌丝生长过程中营养不足,从而抑制菌丝生长。这与师子文等^[23]的研究结果一致,随胁迫温度升高及时间延长,豫香 1 号菌丝胞外漆酶和羧甲基纤维素酶活性降低。此外,在 Yan

等^[24]的研究中,高温胁迫会抑制香菇 *Laccase5* 基因的转录表达,低温则会诱导其表达。在本研究中,2 个香菇品种在受热胁迫后基因表达量均显著下降,且在香 931 菌株中该基因表达量下降程度远低于农科 1 号,这可能是导致 2 个香菇品种耐热能力形成差异的关键基因。

小分子热激蛋白 sHSPs 的分子质量为 12~40 kDa,因此具有多样性,而 HSP20 家族与 HSP40 家族分布最为广泛^[25]。HSP20 作为分子伴侣,与其他蛋白质伴侣结合,防止未折叠蛋白质发生不可逆聚合,从而使其可以应对相关的胁迫条件^[26]。Ling 等^[27]通过农杆菌侵染的方法过表达香菇的 *HSP20* 基因,使其基因表达量上调了 10 倍,在应对 40 °C 高温胁迫时菌丝仍能生长,说明 *HSP20* 基因表达量对香菇耐热能力的提升具有显著影响。在本研究中,2 个香菇菌株在受热胁迫后 *HSP20* 基因表达量均显著上升,说明在 2 个香菇品种中,*HSP20* 是应对热胁迫的重要基因,而在香 931 中上升的程度高于农科 1 号,因此推测 *HSP20* 基因为调控 2 个香菇品种不同耐热表现的关键基因。

综上所述,笔者通过对香菇菌株进行热胁迫处理,研究高温对香菇菌丝生长的影响,发现热胁迫

后,香菇菌丝生长速度显著降低。通过转录组测序,对差异表达基因进行 KEGG 富集分析以及 GO 富集分析,并结合相关数据库,推测漆酶 *Laccase5* 以及 *HSP20* 基因为调控 2 个香菇品种耐热能力形成差异的关键基因,后续可通过过表达以及 RNAi 等方法对这些基因进行功能验证,探究其调控机制,为进一步培育耐高温的香菇菌种提供理论依据。

参考文献

- [1] GOH Y J, KIM Y H, LEE B, et al. A study on decompresses heat pump dryer for drying of shiitake mushrooms at medium temperature[C]/IOP Conference Series. Materials Science and Engineering, 2019, 638(1):012003.
- [2] DAI X F, SHARMA M, CHEN J Y. Fungi in sustainable food production[M]. Switzerland: Springer, 2021.
- [3] SHENG K J, WANG C L, CHEN B T, et al. Recent advances in polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.): Isolation, structures and bioactivities[J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129883.
- [4] KIM Y, LEE U K, EO H J. Influence of storage temperature on levels of bioactive compounds in shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) [J]. Mycobiology, 2023, 51(6): 445-451.
- [5] AHMAD I, ARIF M, XU M M, et al. Therapeutic values and nutraceutical properties of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): A review[J]. Trends in Food Science and Technology, 2023, 134: 123-135.
- [6] LYSAKOWSKA P, SOBOTA A, WIRKIJOWSKA A. Medicinal mushrooms: Their bioactive components, nutritional value and application in functional food production: A review[J]. Molecules, 2023, 28(14): 5393.
- [7] ELKHATEEB W A, DABA G M. Medicinal mushroom: What should we know?[J]. International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis, 2022, 9(1): 1-19.
- [8] SONG T T, ZHANG Z F, LIU S Z, et al. Effect of cultured substrates on the chemical composition and biological activities of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2020, 22(12): 1183-1190.
- [9] ZHANG Y W, CUI Y F, FENG Y B, et al. *Lentinus edodes* polysaccharides alleviate acute lung injury by inhibiting oxidative stress and inflammation[J]. Molecules, 2022, 27(21): 7328.
- [10] CAO X T, BIAN Y B, XIAO X J, et al. Effect of heat stress on *Lentinula edodes* mycelial growth recovery and resistance to *Trichoderma harzianum* [J]. Acta Edulis Fungi, 2015, 22(4): 81-85.
- [11] WANG G Z, CAO X T, MA X L, et al. Diversity and pathogenicity of *Trichoderma* spp. are associated with green mold disease *Lentinula edodes* in China[J]. Microbiology Open, 2016, 5(4): 709-718.
- [12] ZHAO Y, WANG L N, JIANG J, et al. Breeding thermo-tolerant strains of Xianggu mushroom (*Lentinula edodes*) by hybridization method[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(11): 3145-3153.
- [13] 刘萌, 林辰壹, 吴瑞, 等. 香菇菌丝热胁迫响应及耐热综合评价[J]. 中国农业科技导报, 2024, 26(5): 90-100.
- [14] 马超君. 香菇耐高温相关邻氨基苯甲酸合酶基因功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [15] 辛苗苗. 高温胁迫下香菇疏水蛋白和热激蛋白的转录表达量变化及功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [16] KOBAYASHI N, WADA N, YOKOYAMA H, et al. Extracellular enzymes secreted in the mycelial block of *Lentinula edodes* during hyphal growth[J]. AMB Express, 2023, 13(1): 36.
- [17] 刘春如. 香菇的分布概况及生物学特性[J]. 中国林副特产, 2001(4): 32-33.
- [18] EMAYAVARMAN S, SINGH S. Efficacy of different physiological parameters on mycelial growth of elm oyster mushroom [*Hypsizygus ulmarius* (Bull.) Redhead] [J]. Plant Archives, 2021, 21(1): 1441-1445.
- [19] HOA H T, WANG C L. The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*) [J]. Mycobiology, 2015, 43(1): 14-23.
- [20] JANUSZ G, PAWLIK A, ŚWIDERSKA-BUREK U, et al. Laccase properties, physiological functions, and evolution[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 966.
- [21] NAGAI M, KAWATA M, WATANABE H, et al. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: Purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies[J]. Microbiology-SGM, 2003, 149(9): 2455-2462.
- [22] JANUSZ G, PAWLIK A, SULEJ J, et al. Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution[J]. FEMS Microbiol Reviews, 2017, 41(6): 941-962.
- [23] 师子文, 吴杰, 胡素娟, 等. 高温对香菇菌丝生理特性的影响及胁迫等级构建[J]. 食用菌学报, 2024, 31(5): 53-63.
- [24] YAN L L, XU R P, DAI S H, et al. Overexpression of a laccase gene *Lelcc1* and phenotypic characterizations in *Lentinula edodes* [J]. Mycosystema, 2019, 38(6): 831-840.
- [25] LIANG B J, GUERRERO M E, PRINCE T L, et al. The functions and regulation of heat shock proteins; key orchestrators of proteostasis and the heat shock response[J]. Archives of Toxicology, 2021, 95(6): 1943-1970.
- [26] ZHANG N, JIANG J. Research advances of small heat shock protein gene family (*sHSPs*) in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(6): 943-948.
- [27] LING Y Y, LING Z L, ZHAO R L. Construction of a heat-resistant strain of *Lentinus edodes* by fungal Hsp20 protein overexpression and genetic transformation[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1009885.