

苏文英, 纪伟, 刘晓梅, 等. 羊肚菌响应白霉病菌感染的转录组分析及关键基因克隆[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(6): 1239-1250.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2026.06.016

羊肚菌响应白霉病菌感染的转录组分析及关键基因克隆

苏文英, 纪伟, 刘晓梅, 王一璞, 任立凯
(连云港市农业科学院, 江苏 连云港 222006)

摘要: 羊肚菌白霉病是由长孢假单隔孢(*Pseudodiploëspora longispora*)感染引起的羊肚菌常见病害, 常导致羊肚菌产量减少和品质降低。为明确长孢假单隔孢对羊肚菌的致病机理, 挖掘羊肚菌响应白霉病菌病原菌感染的关键基因, 本研究通过转录组测序技术对白霉病菌病原菌感染前(M1)与感染3 d(M2)和感染5 d(M3)的差异表达基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 并对关键基因进行克隆验证。结果表明, 感染前与感染3 d比较组、感染前与感染5 d比较组分别筛选出差异表达基因1 008个和2 955个, 羊肚菌中更多基因随感染时间延长被诱导表达。根据GO分类结果, 感染前与感染3 d比较组差异表达基因主要富集在DNA整合、DNA代谢过程等生物学功能, 感染前与感染5 d比较组差异表达基因主要富集在碳水化合物代谢过程、膜部分及氧化还原过程等生物学功能。随着感染时间延长, 羊肚菌抗氧化能力及物质代谢活动显著增强。根据KEGG信号通路富集分析结果, 感染前与感染5 d比较组差异表达基因在次级代谢产物的生物合成、半乳糖代谢、氨基酸的生物合成、糖酵解/糖异生、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路-酵母等通路中的富集程度较高, 这些通路可能与羊肚菌响应白霉病菌感染密切相关。长孢假单隔孢感染能激活羊肚菌高渗甘油-MAPK(HOG-MAPK)信号通路, 编码*Ste11*、*Ssk2*和*Ssk22*、*HOG1*基因表达量上调, 细胞通过积累甘油来维持渗透压平衡。糖酵解途径中, 磷酸甘油醛脱氢酶基因、磷酸甘油酸激酶基因、磷酸甘油酸变位酶基因、烯醇化酶基因、丙酮酸激酶基因等多个基因表达水平下调, 表明白霉病菌病原菌感染能抑制丙酮酸生成, 进而影响羊肚菌生长发育。克隆获得的MAPK信号通路基因*Ms-hog1* cDNA序列全长1 050 bp, MSHOG1蛋白与真菌HOG1蛋白家族有较高的同源性, 且与真菌HOG1同源蛋白都具有“TGY”双重磷酸化位点。本研究结果为羊肚菌抗病育种提供了理论基础。

关键词: 转录组; 白霉病; 羊肚菌; 基因克隆

中图分类号: S436.46⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2026)06-1239-12

Transcriptome analysis and key gene cloning of *Morchella esculenta* in response to white mold pathogen infection

SU Wenying, JI Wei, LIU Xiaomei, WANG Yipu, REN Likai
(Lianyungang Academy of Agricultural Sciences, Lianyungang 222006, China)

Abstract: *Morchella esculenta* white mold is a common disease caused by *Pseudodiploëspora longispora*, which often

leads to the decrease of yield and quality of *Morchella esculenta*. In order to clarify the pathogenic mechanism of *P. longispora* on *Morchella esculenta* and explore the key genes of *M. esculenta* in response to the infection of pathogen of white mold, this study used transcriptome sequencing technology to perform gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis on differentially expressed genes before (M1) and

收稿日期: 2025-09-16

基金项目: 连云港市财政专项(QNJ2402); 连云港市“521工程”项目(LYG065212024113)

作者简介: 苏文英(1992-), 女, 河南驻马店人, 硕士, 助理研究员, 主要从事食用菌遗传育种工作。(E-mail) 18004425758@163.com

通讯作者: 任立凯, (E-mail) 2949823@qq.com

three days (M2), five days (M3) after infection by pathogen of white mold, and the key gene was cloned and verified. The results showed that 1 008 and 2 955 differentially expressed genes were screened in the comparison group before infection and three days after infection, and the comparison group before infection and five days after infection, respectively. More genes were induced with the extension of infection time. According to the GO classification results, the differentially expressed genes in the comparison group before infection and three days after infection were mainly enriched in biological functions such as DNA integration and DNA metabolism. The differentially expressed genes in the comparison group before infection and five days after infection were mainly enriched in biological functions such as carbohydrate metabolism, membrane part and redox process. As the infection time was prolonged, the antioxidant capacity and metabolic activity of *M. esculenta* were significantly enhanced. According to the KEGG pathway enrichment analysis results, the differentially expressed genes in the comparison group before infection and five days after infection were highly enriched in the biosynthesis of secondary metabolites, galactose metabolism, biosynthesis of amino acids, glycolysis/gluconeogenesis, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway-yeast and other pathways. These pathways may be closely related to the response of *M. esculenta* to *P. longispora* infection. The infection of *P. longispora* could activate the high osmolarity glycerol-MAPK (HOG-MAPK) signaling pathway of *M. esculenta*, and the expression levels of genes encoding *Ste11*, *Ssk2*, *Ssk22* and *HOG1* were up-regulated. The cells maintained osmotic pressure balance by accumulating glycerol. In the glycolysis pathway, the expression levels of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase gene, phosphoglycerate kinase gene, phosphoglycerate mutase gene, enolase gene, pyruvate kinase gene and other genes were down-regulated, indicating that the infection of pathogen of white mold could inhibit the production of pyruvate, which in turn affected the growth and development of *M. esculenta*. The full-length cDNA sequence of MAPK signaling pathway gene *Mshog1* obtained by cloning was 1 050 bp. The MSHOG1 protein had high homology with the fungal HOG1 protein family, and had the same "TGY" double phosphorylation site as the fungal HOG1 homologous proteins. The results of this study provide a theoretical basis for disease resistance breeding of *M. esculenta*.

Key words: transcriptome; white mold; *Morchella esculenta*; gene cloning

羊肚菌 (*Morchella esculenta*) 又称羊肚菜、羊蜂窝蛾子等, 主要生长在林地草丛中, 在世界范围内分布广泛。作为一种珍稀食用菌, 羊肚菌富含多糖、氨基酸及不饱和脂肪酸等物质, 具有独特的口感与丰富的营养成分, 还具有抗肿瘤、抗病毒、抗疲劳、保肝、保肾及调节机体免疫功能和血脂等多种功效, 深受广大消费者的青睐^[1-3]。近年来, 随着市场需求的日益增长, 以及生产羊肚菌所需劳动强度低、周期短及营养价值高的特点, 羊肚菌的人工栽培规模不断扩大。但羊肚菌生长过程中, 常面临高温、高湿以及病原菌侵袭等多种逆境胁迫, 这些因素严重制约羊肚菌的产量与品质^[4-5]。其中, 羊肚菌白霉病是羊肚菌子实体时期由长孢假单隔孢 (*Pseudodiploöspora longispora*) 等病原菌侵染形成的常见病害^[6-7]。羊肚菌白霉病病原菌以土壤为重要传播媒介, 通过菌丝、孢子或农事操作在田间扩散, 在重茬地或高温高湿环境下扩散迅速。羊肚菌白霉病已成为限制羊肚菌产业、规模化发展的关键瓶颈, 但截至目前, 羊肚菌白霉病仍没有有效的防治措施。

转录组学通过检测特定条件下细胞内所有转录

本 (mRNA 等) 的种类与丰度, 从而反映基因表达的动态变化, 为揭示病害侵染过程中的分子机制、宿主防御响应及病原菌致病策略提供关键技术支撑。目前, 该技术被广泛应用于双孢蘑菇、羊肚菌等多种食用菌病害研究。Yu 等^[8] 研究发现, 长毛拟青霉病原菌侵染六妹羊肚菌后, 从长毛拟青霉和羊肚菌中分别鉴定出 460 个差异表达基因和 313 个差异表达基因, 其中长毛拟青霉中 β -葡聚糖酶、甘露聚糖酶等碳水化合物活性酶 (CAZymes) 以及枯草杆菌蛋白酶家族基因均呈现上调表达, 六妹羊肚菌中几丁质识别蛋白、咖啡因诱导死亡蛋白及假定凋亡诱导蛋白相关基因表达上调, 而细胞周期蛋白基因表达下调。Wang 等^[9] 研究发现, 长孢假单隔孢侵染六妹羊肚菌后, 六妹羊肚菌中差异表达基因在氧化还原酶活性相关、过氧化物酶体、脂质转运与代谢、细胞壁组装以及细胞膜整合成分等相关通路中显著富集, 其中 *PRX1*、*SOD2*、*catB*、*GAS4*、*FET3*、*ptr2*、*ORF9*、*PXMP2* 和 *Hxt1* 等基因在六妹羊肚菌的抗病响应中发挥关键调控作用。Chen 等^[10] 研究发现, 长毛拟青霉病原菌侵染羊肚菌后, 长毛拟青霉基因组中 24 个基因表达量上调, 25 个基因

表达量下调;上调基因包括白喉酰胺生物合成基因、醛还原酶基因、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)[NAD(P)H]-水合物差向异构酶基因等。Yang等^[11]的研究结果表明,在羊肚菌红脚病形成过程中,差异表达基因显著富集于酪氨酸代谢、核黄素代谢及甘油磷脂代谢通路。Yang等^[12]利用转录组技术,筛选出10个双孢蘑菇抵御托拉斯假单胞杆菌(*Pseudomonas tolaasii*)侵染的核心基因。Bailey等^[13]研究发现,双孢蘑菇受到真菌菌生轮枝孢(*Lecanicillium fungicola*)侵染时,与细胞壁增强、抗病防御反应、能量代谢及抗氧化相关的基因均显著上调表达。

近年来,*HOG*基因及其介导的丝裂原活化蛋白激酶(*MAPK*)信号通路在真菌生长发育调控、非生物胁迫应答、病原真菌致病力调控及细胞周期调控等过程中的作用得到了初步研究。许机分等^[14]研究指出,高渗甘油-*MAPK*(*HOG-MAPK*)信号通路是真菌适应环境与维持自身生理稳态的关键通路之一。吴雪兰等^[15]的研究结果表明,*HOG-MAPK*信号通路与斑玉蕈菌丝增殖生长和子实体形成有关。解凡等^[16]研究发现,氨基酸、核糖体和类固醇生物合成及氮类物质代谢等通路在肺形侧耳响应低温胁迫的过程中发挥重要作用,低温处理下*HOG-MAPK*通路上的多数基因过表达,且表达量显著高于常温对照。徐岩岩^[17]的研究结果表明,托拉斯假单胞杆菌弱毒菌株可诱导平菇产生水杨酸,且平菇子实体中*HOG*基因表达量显著升高,进而增强平菇对细菌性褐斑病病原菌的抗病性。Xia等^[18]研究发现,*FvHog1*、*FvPbs2*、*FvSsk2*基因缺失会导致轮枝镰孢菌(*Fusarium verticillioides*)分生孢子形成缺陷、对 Ca^{2+} 的敏感性显著增强、伏马菌素FB1合成量减少,进而造成轮枝镰孢菌致病力降低。

鉴于长孢假单隔孢侵染羊肚菌的机制尚不明确,本研究利用转录组学技术对羊肚菌感染长孢假单隔孢病原菌后3 d及5 d子实体中差异表达基因进行分析,筛选长孢假单隔孢病原菌侵染不同时间的差异表达基因,挖掘响应白霉病原菌侵染的相关候选基因,为全面地理解羊肚菌响应白霉病原菌侵染的分子机制及进一步选育抗病羊肚菌品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

本研究使用的羊肚菌子实体,采集于连云港市

农业科学院的玉带河试验基地。长孢假单隔孢病原菌,是从发病的羊肚菌子实体中分离获得的,其分类地位已通过形态学和分子生物学技术得到鉴定^[19]。本试验选取羊肚菌子实体的子囊果部分作为研究对象,将长孢假单隔孢纯培养物接种至马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,于25℃培养箱中培养7 d,取适量无菌水冲洗培养基表面孢子制成每1 mL 1×10^5 个孢子的菌液,备用。当羊肚菌子囊果长度至3~4 cm时,用接种针划破健康羊肚菌子囊果造成伤口,取0.5 cm×0.5 cm规格的无菌滤纸充分蘸取制备好的孢子液,贴附于伤口处完成接种,接种前(M1,未受病原菌侵染)、接种3 d(M2,侵染3 d)、接种5 d(M3,侵染5 d)分别采集子囊果伤口周围组织,用液氮速冻后于-80℃保存,用于转录组分析。每次取样设3次重复。

1.2 RNA制备、测序文库构建及高通量测序

按照TRIzol试剂盒(美国Invitrogen公司产品)说明书进行所有羊肚菌样本的总RNA提取,并利用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA是否存在污染及降解情况。检测合格后使用Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer生物分析仪(美国Agilent Technologies公司产品)检测羊肚菌样本总RNA浓度和纯度。将检测合格的样品委托北京诺禾致源科技股份有限公司构建cDNA文库,并利用Illumina HiSeq™2500平台(美国Illumina公司产品)进行高通量测序,获取不同样本羊肚菌转录组数据。

1.3 序列比对和新基因预测

对测序获得的原始数据进行过滤筛选,得到高质量数据(Clean data)。使用HISAT2v2.0.5软件将高质量数据(Clean read)与六妹羊肚菌(*Morchella sextelata*)参考基因组数据(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行序列比对。采用StringTie 1.3.3b软件进行新基因预测^[20]。

1.4 差异表达基因分析

采用DESeq2软件进行不同处理差异表达基因分析^[21],差异表达基因筛选阈值为 P_{adj} (多重假设检验校正后的 P 值) <0.05 且 $|\log_2 FC|$ (FC 为差异倍数) >1 。针对筛选得到的差异表达基因,利用ClusterProfiler(3.8.1)软件开展基因本体(GO)功能富集分析,并对KEGG通路中的差异表达基因进行统计富集,从而筛选出羊肚菌响应白霉病侵染过程相关的差异表达基因。

1.5 响应白霉病侵染的羊肚菌差异表达基因实时荧光 PCR (qRT-PCR) 验证

为验证 RNA-seq 结果的可靠性,本研究选取 10 个羊肚菌响应白霉病侵染过程中差异表达的基因,进行实时定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 验证,10 个差异表达基因 PCR 引物见表 1,内参基因为 *18S RNA*。qRT-PCR 反应体系为 20.0 μL,包括 SGEExcel

FastSYBR Mixture 10.0 μL,10.0 μmol/L正向引物和 10.0 μmol/L反向引物各 0.4 μL,cDNA 100.0 ng,用 ddH₂O 补足至 20.0 μL。qRT-PCR 反应程序为 95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 45 s,循环 45 次。PCR 反应体系的配制需在冰上操作。采用 2^{-ΔΔC_t}法计算目的基因的相对表达量。

表 1 qPCR 反应所用引物
Table 1 Primers used for qPCR

基因编号	基因名称	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
68328685	<i>18S RNA</i>	GCAAGAACAACCTCAAGCCG	GGTCTTATTCTTCGCACAAAC
68334900	<i>SOD</i>	CCCGCAAAGCACAACTGA	TTATGAACCACGATGGAACGA
68328626	<i>PGMI</i>	GACCCTACGGTATTGCCATCT	GAGAGTGGGCATAGGTGAGGT
68330809	<i>Hog1</i>	CAGTCGCTTCCAAAGAGGG	TCGGTGGGATCGTGATAGG
68325120	<i>aroE</i>	GGAGAAGTTTGAGAGGGCTGA	GTATCGGCTTTGGGTGCTCT
68328974	<i>Ank</i>	CTCGCTACACCTACGCCACT	GCTCACATTTCCACCCCTTAG
68334779	<i>TYR</i>	CTTCCAAGCGTCCATAGC	AGTCAATCAGCCAGTCCCAGT
68324987	<i>GalD</i>	CTTGCGCTCCCTATTACTCG	TCCTCGGTTGCGTTCATTT
68332975	<i>GLA</i>	CCATCCCGCCGAGTTCTAT	TCGTACTTCTTTCCCGCCTT
68328641	<i>GALT</i>	CACAAAGGGCAAGTGCTACG	GGTCCAGGTGTGTATTATCGG
68324580	<i>TRP</i>	GGAATACCGCTCTTACTACCCA	TCACGCTTGAGCCAGATGTT

1.6 关键基因克隆分析

羊肚菌 *Mshog1* (68330809) 基因来源于羊肚菌转录组数据库,用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1)。以羊肚菌 cDNA 为模板,利用设计好的特异性引物进行 PCR 扩增。扩增完成后,采用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,以观察是否出现预期大小的条带。利用凝胶回收试剂盒(杭州爱思进生物技术有限公司产品)回收产物。将回收的产物纯化后连接至 pEASY-T1 载体(北京全式金生物技术有限公司产品),连接产物用大肠杆菌转化。将转化产物均匀涂布于平板上,于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 16 h,随后挑取单菌落接种至 5 mL 含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基,在 200 r/min、37 ℃ 条件下振荡培养 12~16 h,至菌液 600 nm 吸光度(*OD*₆₀₀)达 0.6~0.8。进一步对重组克隆载体开展菌液 PCR 鉴定,并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将测序结果与羊肚菌转录组数据进行比对,并利用 DNAMAN 软件与 ORF Finder 在线工具对其基因结构特征进行分析。

2 结果与分析

2.1 转录组测序数据组装与统计

羊肚菌转录组测序结果如表 2 所示。9 个羊肚菌样本平均每个样本获得 44 611 501 条原始测序数据(Raw reads),经质控过滤后,平均每个样本得到 43 061 737 条高质量有效数据(Clean reads)。通过与羊肚菌参考基因组比对,比对率均达 93.90% 及以上,说明测序数据与参考基因组具有较好的匹配度,可以进行后续分析。9 个样本平均有效碱基数约为 6.46 G,*Q20*(质量值≥20 的碱基所占百分比)为 97.13%~97.68%,*Q30*(质量值≥30 的碱基所占百分比)为 92.63%~93.94%,G+C 碱基含量为 50.55%~51.58%。各样本 *Q20* 和 *Q30* 值均处于较高水平,表明测序错误率较低,数据可靠性高。G+C 碱基含量分布在合理范围内,符合真核生物基因组特征。

2.2 不同样品间基因表达水平相关性分析

不同样本基因表达水平相关性分析表 3 所示。

M1 处理 3 个样本间的相关系数为0.963~0.977;M2 处理 3 个样本间的相关系数为0.963~0.979;M3 处理 3 个样本间的相关系数为0.938~0.958,说明不同处理的 3 个样本的生物学重复一致性良好,试验操作稳定,数据可信度高。

2.3 差异表达基因分析

M1 与 M2 比较组、M1 与 M3 比较组共鉴定出

3 963个差异表达显著的基因。其中,M2 与 M1 比较组差异表达基因数量1 008个,其中在 M2 样本中表达上调基因数量 772 个,下调表达基因数量 236 个,而 M3 与 M1 比较组差异表达基因数量2 955个,其中在 M3 样本中表达上调基因数量1 601个,下调表达基因数量1 354个,说明随着白霉病菌入侵时间的增加,羊肚菌中更多基因被诱导表达(表 4)。

表 2 羊肚菌转录组数据质量

Table 2 Transcriptome data quality assessment of *Morchella esculenta*

样本	原始测序数据 (条)	原始碱基数 (G)	高质量数据 (条)	有效碱基数 (G)	比对率 (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	G+C 含量 (%)
M1_1	44 868 576	6.73	43 600 644	6.54	95.15	97.67	93.94	51.58
M1_2	47 304 546	7.10	45 587 990	6.84	94.81	97.13	92.63	51.29
M1_3	40 478 084	6.07	39 389 708	5.91	94.98	97.51	93.48	51.12
M2_1	46 965 954	7.04	45 661 380	6.85	95.32	97.54	93.53	51.11
M2_2	45 050 956	6.76	43 589 414	6.54	95.25	97.59	93.64	51.14
M2_3	43 036 206	6.46	41 437 726	6.22	95.48	97.59	93.57	50.55
M3_1	45 244 468	6.79	41 808 284	6.27	94.02	97.54	93.59	51.13
M3_2	45 325 180	6.80	44 184 330	6.63	93.90	97.61	93.69	51.12
M3_3	43 229 542	6.48	42 296 160	6.34	94.17	97.68	93.91	51.44

M1_1、M1_2、M1_3 为长孢假单隔孢侵染前对照样本;M2_1、M2_2、M2_3 为长孢假单隔孢侵染 3 d 样本;M3_1、M3_2、M3_3 为长孢假单隔孢侵染 5 d 样本。Q20:测序碱基质量值达到 20 以上的碱基数目占原始数据的百分比;Q30:测序碱基质量值达到 30 以上的碱基数目占原始数据的百分比。

表 3 样本数据相关性

Table 3 Data correlation between samples

样本	M1_1	M1_2	M1_3	M2_1	M2_2	M2_3	M3_1	M3_2	M3_3
M1_1	1.000	0.974	0.963	0.926	0.916	0.941	0.873	0.863	0.878
M1_2	0.974	1.000	0.977	0.934	0.927	0.943	0.871	0.856	0.870
M1_3	0.963	0.977	1.000	0.946	0.943	0.947	0.881	0.868	0.874
M2_1	0.926	0.934	0.946	1.000	0.979	0.967	0.925	0.919	0.919
M2_2	0.916	0.927	0.943	0.979	1.000	0.963	0.915	0.914	0.908
M2_3	0.941	0.943	0.947	0.967	0.963	1.000	0.919	0.915	0.915
M3_1	0.873	0.871	0.881	0.925	0.915	0.919	1.000	0.958	0.951
M3_2	0.863	0.856	0.868	0.919	0.914	0.915	0.958	1.000	0.938
M3_3	0.878	0.870	0.874	0.919	0.908	0.915	0.951	0.938	1.000

M1_1、M1_2、M1_3、M2_1、M2_2、M2_3、M3_1、M3_2、M3_3 见表 2 注。

表 4 不同比较组差异表达基因数量

Table 4 Number of differentially expressed genes in different comparison groups

比较组	总差异表达基因 数量(个)	上调基因数量 (个)	下调基因数量 (个)
M2 与 M1	1 008	772	236
M3 与 M1	2 955	1 601	1 354

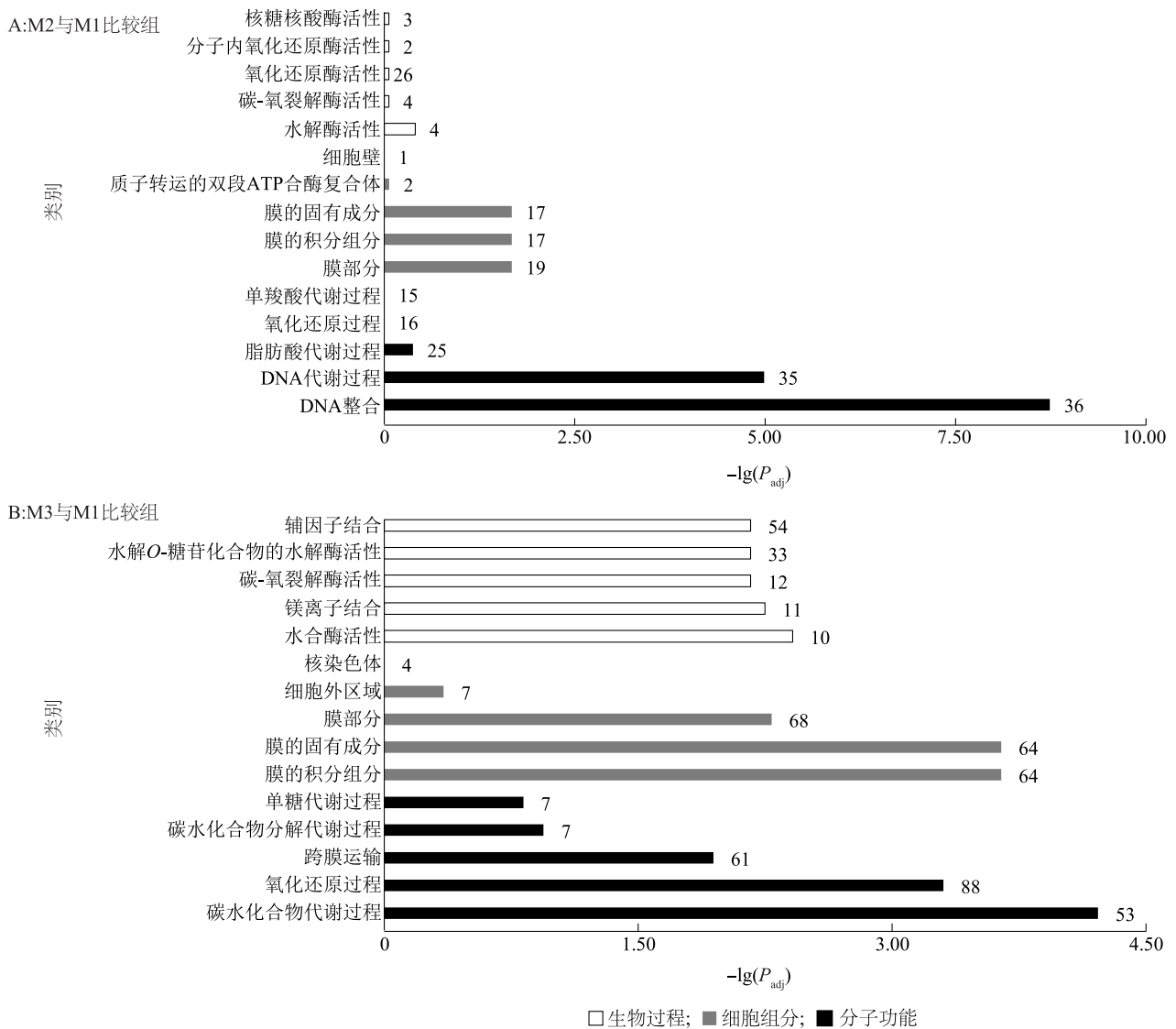
M1:接种前样本;M2:长孢假单隔孢侵染 3 d 样本;M3:长孢假单隔孢侵染 5 d 样本。

2.4 羊肚菌受白霉病菌侵染不同时期差异表达基因 GO 功能注释分析

M2 与 M1 比较组共注释到 312 个差异表达基因,分别有 124 个、156 个、32 个差异表达基因注释到生物过程(Biological process, BP)、分子功能(Molecular function, MF)、细胞组分(Cell component, CC),其中差异表达基因富集前 5 的生物学功能为 DNA 整合、DNA 代谢过程、膜部分、膜的积分组分以

及膜的固有成分等(图 1A)。M3 与 M1 比较组共注释到 1 117 个差异表达基因, 分别有 410 个、560 个、147 个差异表达基因注释到生物过程、分子功能和细胞组分(图 1B)。差异表达基因富集前 5 的生物

学功能为碳水化合物代谢过程、氧化还原过程、膜部分、膜的积分组分、膜的固有成分。由此可见, 随着侵染时间延长, 羊肚菌的抗氧化能力及物质代谢活动显著增强。



P_{adj} : 检验校正后的 P 值。M1、M2、M3 见表 4 注。柱上数字表示差异表达基因数量。

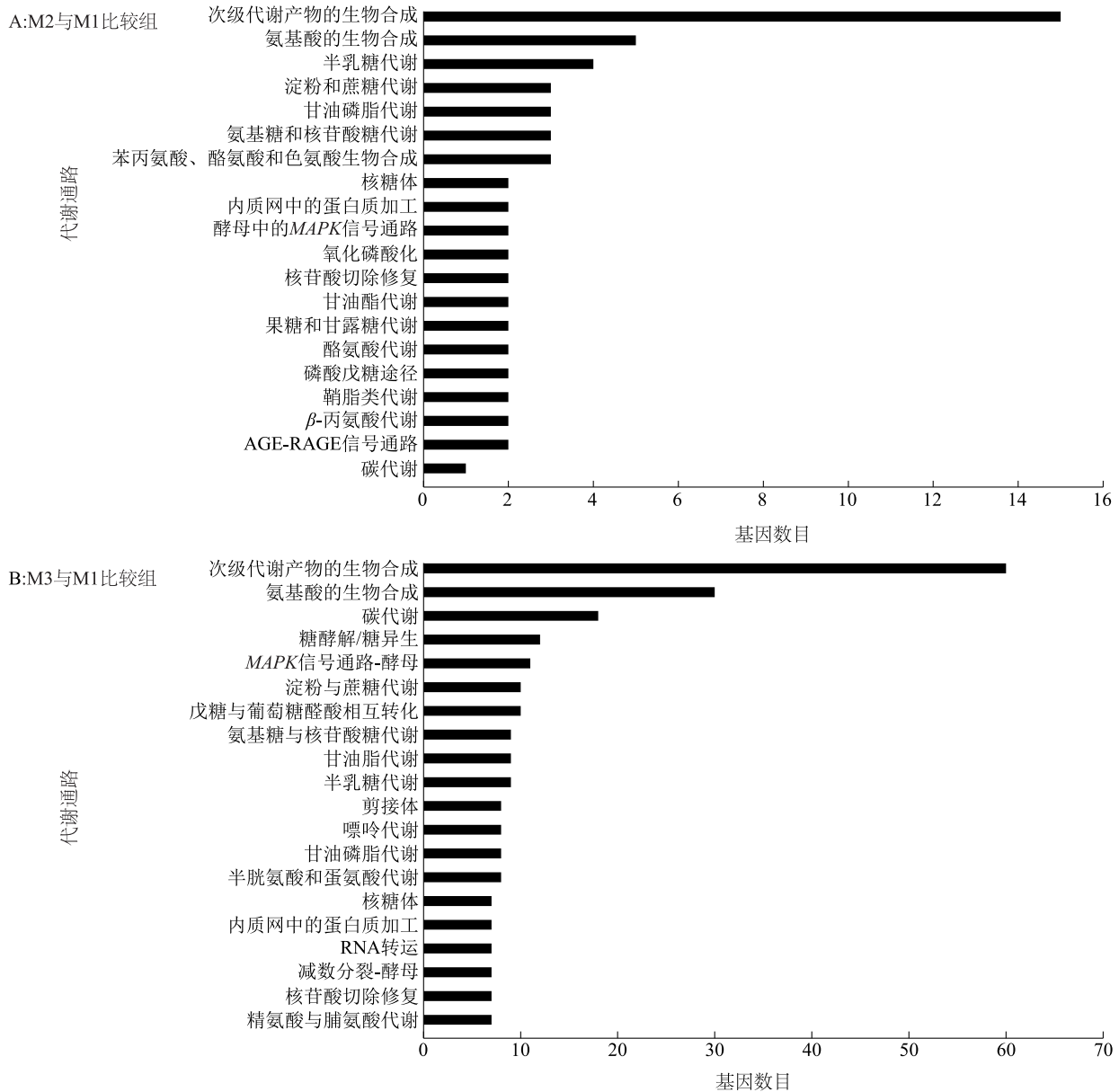
图 1 不同比较组差异表达基因的基因本体 (GO) 分类

Fig.1 Gene ontology (GO) classification of differentially expressed genes in different comparison groups

2.5 差异表达基因 KEGG 信号通路富集分析结果

M2 与 M1 比较组中共有 45 个差异表达基因被注释到 45 条 KEGG 代谢通路中; M3 与 M1 比较组中共有 234 个基因被注释到 80 条 KEGG 代谢通路中。M1 与 M2、M1 与 M3 比较组中差异表达基因富集程度排名前 20 位的代谢通路如图 2 所示。从图中可以看出, M2 与 M1 比较组差异表达基因主要富

集在次级代谢产物的生物合成、氨基酸的生物合成、半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、甘油磷脂代谢等代谢通路(图 2A); M3 与 M1 比较组差异表达基因主要富集在次级代谢产物的生物合成、氨基酸的生物合成、碳代谢、糖酵解/糖异生、MAPK 信号通路-酵母等代谢通路(图 2B), 这些通路可能与羊肚菌响应白霉病菌侵染密切相关。



M1、M2、M3 见表 4 注。MAPK:丝裂原活化蛋白激酶;AGE-RAGE:晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体。

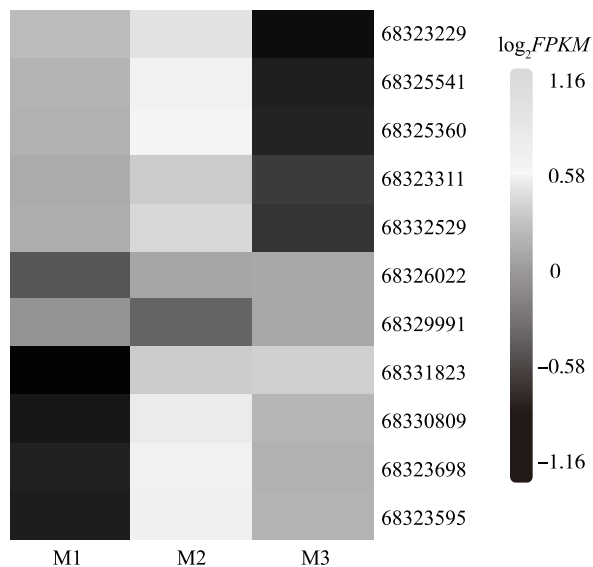
图 2 不同比较组差异表达基因 KEGG 信号通路富集分析

Fig.2 KEGG signal pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in different comparison groups

2.6 抗病通路分析

羊肚菌响应白霉病菌感染的抗病通路 MAPK 级联途径和糖酵解途径分别如图 3 和图 4 所示。M3 与 M1 比较组 MAPK 级联途径中共鉴定出 11 个差异表达基因(图 3),其中长孢假单隔孢侵染 5 d 处理(M3)中 6 个差异表达基因表达量上调,5 个差异表达基因表达量下调,HOG-MAPK 合成通路中编码 *ste11* (68323698、68329991)、*Ssk2* 和 *Ssk22* (68326022)、*HOG1* (68330809) 的基因均上调表达。

M2 与 M1 比较组、M3 与 M1 比较组糖酵解/糖异生途径中共鉴定出 12 个差异表达基因,随着侵染时间增加,除磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(*PEPCK*) (68322318)表达量上调外,其余差异表达基因表达量均下调。其中 5 个显著下调差异表达基因参与糖酵解第 2 阶段,包括磷酸甘油醛脱氢酶(68333094)、磷酸甘油酸激酶(68329233)、磷酸甘油酸变位酶(68328626)、烯醇化酶(68332520)、丙酮酸激酶(68324780)(图 4)。



M1、M2、M3 见表 4 注。FPKM: 每百万比对片段中每千碱基长度的转录本片段数。

图 3 白霉病原菌感染羊肚菌过程中丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 级联途径差异表达基因及其表达水平变化

Fig.3 Differentially expressed genes of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade pathway and their expression levels during the infection of *Morchella esculenta* by white mold pathogen

2.7 差异表达基因 qRT-PCR 验证

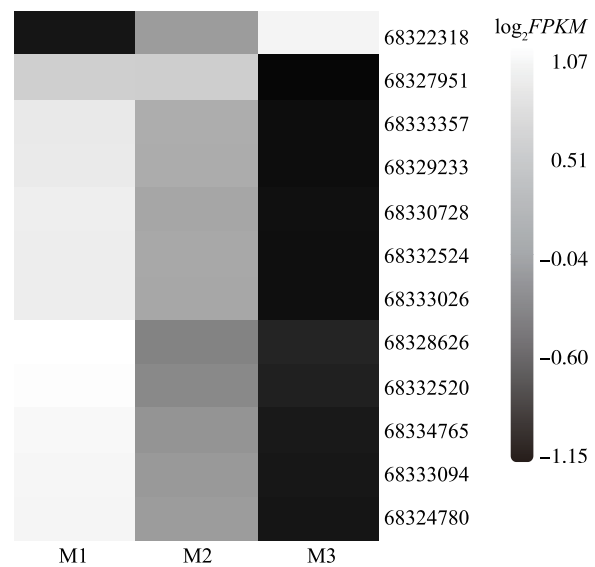
差异表达基因 *SOD*、*PGM-1*、*Mshog1*、*aroE*、*ANK*、*TYR*、*GalD*、*GLA*、*GALT*、*TRP* qRT-PCR 检测结果如图 5 所示。从图中可以看出,qRT-PCR 检测结果和 RNA-seq 测序结果具有较高的一致性,这表明本研究得到的转录组测序结果准确可靠,能够真实体现白霉病菌感染过程中羊肚菌子实体中基因表达水平变化。

2.8 *Mshog1* 的基因克隆和基因结构特征分析

基于 DNAMAN 软件与 ORF Finder 在线工具预测得出,*Mshog1* 基因包含一段长度为 1 050 bp 的完整开放阅读框 (ORF)。针对预测得到的 ORF 设计特异性引物,经 RT-PCR 扩增获得目标片段,并将其重组至 pMD18-T 载体中。重组载体的 PCR 验证结果如图 6A 所示。从图中可以看出,实际获得的序列与预测结果基本一致。

BLASTp 同源性比对结果表明,所获基因属于 HOG1 家族丝裂原活化蛋白激酶基因 (图 6B),因此,将该基因命名为 *Mshog1*。

MSHOG1 蛋白与巨大平盘菌 (*Discina gigas*)、松露



M1、M2、M3 见表 4 注。FPKM 见图 3 注。

图 4 白霉病原菌感染羊肚菌过程中糖酵解途径差异表达基因及其表达水平变化

Fig.4 Differentially expressed genes and their expression levels in glycolysis pathway during the infection of *Morchella esculenta* by white mold pathogen

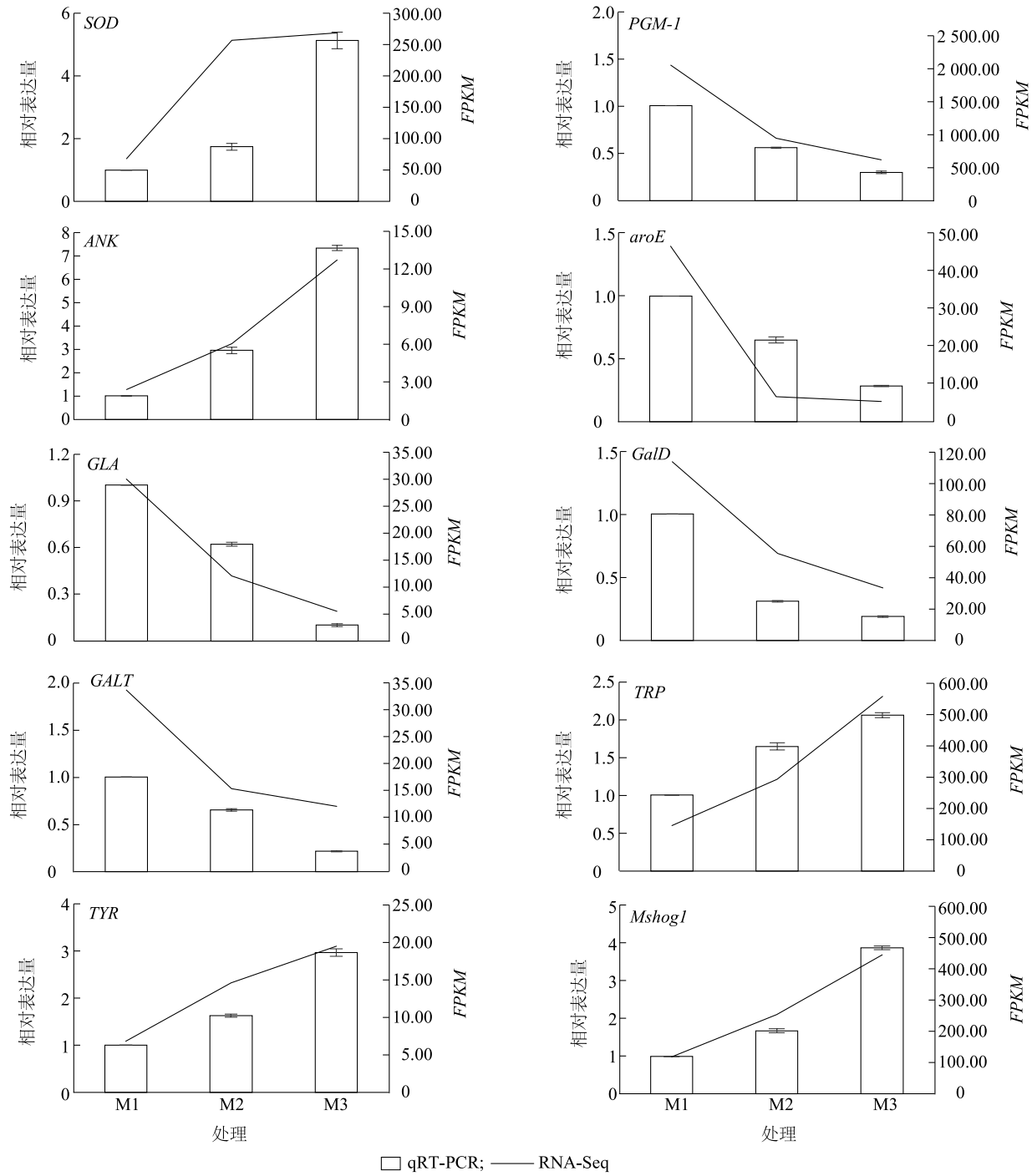
(*Tuber aestivum*)、刺孢盘菌 (*Peziza echinospora*)、意大利白块菌 (*Tuber magnatum*) 等真菌 HOG1 蛋白氨基酸序列比对结果如图 6C 所示。从图中可以看出,MSHOG1 蛋白与真菌 HOG1 蛋白家族有较高的同源性。MSHOG1 蛋白与 *Discina gigas* 真菌 HOG1 蛋白 (KAL0638157.1) 的相似度为 99.71%,与松露 HOG1 蛋白 (CUS10301.1) 的相似度为 97.99%,与意大利白块菌 HOG1 蛋白 (PWW73152.1) 的相似度分别为 97.70%,与刺孢盘菌 HOG1 蛋白的相似度 (KAI5785031.1) 相似度分别为 97.42%,且上述 HOG1 蛋白均具有的“TGY”双重磷酸化位点。

3 讨论

病虫害等生物胁迫会引发食用菌复杂的防御机制,从而引起相关基因表达水平的变化^[22]。本研究通过转录组分析,揭示了羊肚菌在受到白霉病菌感染时,MAPK 级联途径、糖酵解等途径差异基因的表达变化,为解析羊肚菌响应白霉病菌感染提供了重要线索。

3.1 促分裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联途径

MAPK 级联途径广泛存在于各类生物体中,其在进化过程中展现出高度的保守性,该通路与植物



FPKM 见图 3 注。
图 5 部分差异表达基因的转录组测序与 qRT-PCR 检测结果比较
Fig.5 Comparison of RNA-seq and qRT-PCR results of some differentially expressed genes

的生长发育和逆境胁迫响应密切相关^[23]。Hohmann^[24]研究发现,啤酒酵母中至少存在 FUS3、KSS1、HOG1、MPK1、SMK1 等 5 种 MAPK 信号途径,这些信号通路能接受不同的胞外刺激,分别调控细胞壁

结构完整性、酵母的配接反应、孢子分化、菌丝生长以及高渗透压条件下甘油形成过程。其中,HOG-MAPK 信号通路是酵母应对高渗透压应激的关键信号通路,对于高渗透压环境下酵母细胞维持细胞内

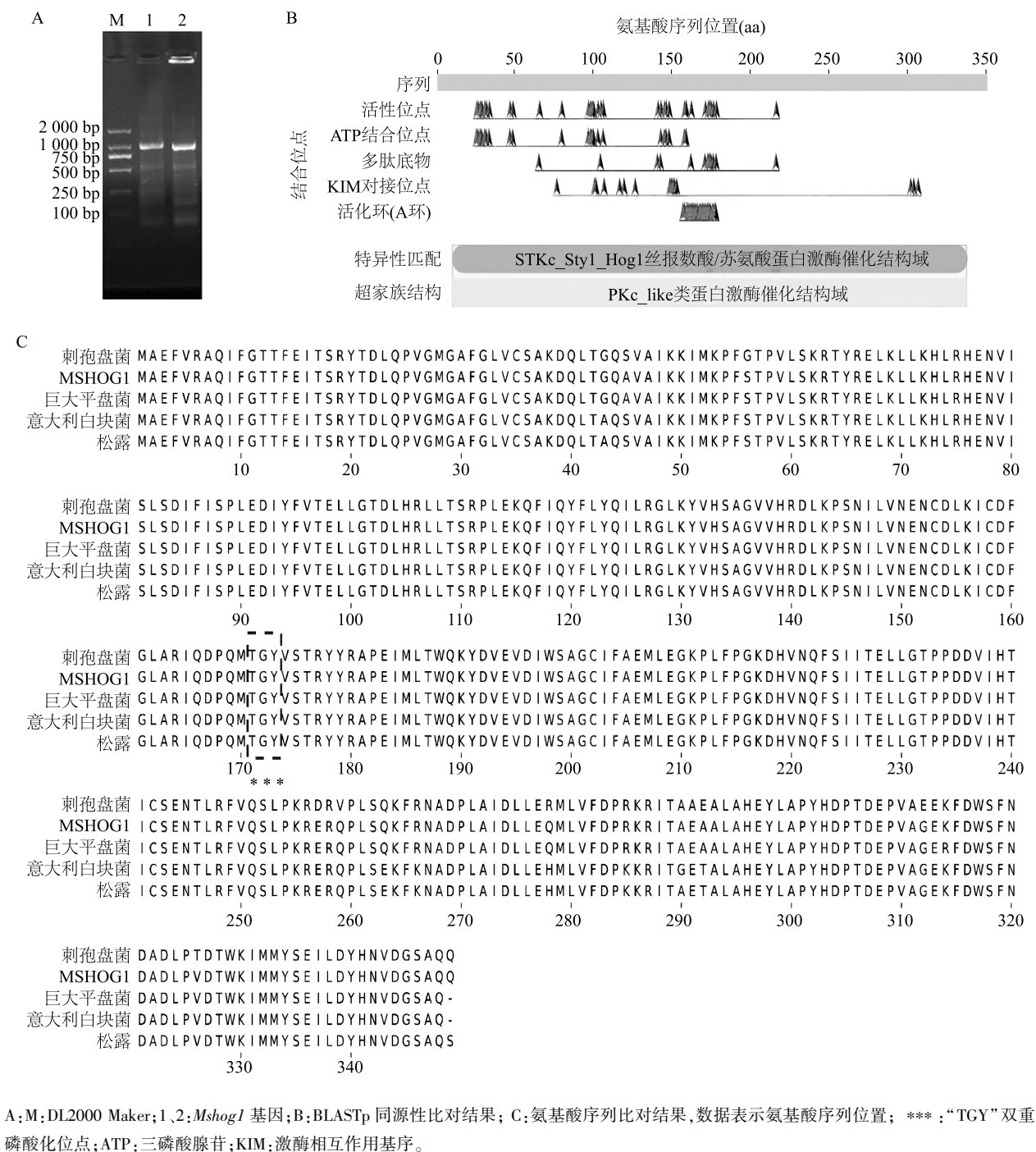


图 6 *Mshog1* 基因结构特征分析
Fig.6 Analysis of structural characteristics of *Mshog1*

外的渗透压平衡是必不可少的,其核心作用是通过激酶级联反应传递应激信号,使细胞适应环境变化。HOG-MAPK 信号通路的核心组分是 Hog1,该通路主要由 Hog1 (MAPK)、Pbs2 (MAPKK) 以及 Ste11、Ssk2 和 Ssk22 (Ssk2 的同工蛋白) 3 个 MAPKKK 组成。该信号通路在上游分为 Ste11 和 Ssk2/Ssk22 两

支,并在 Pbs2 处汇合^[25]。本研究结果表明,白霉病菌感染羊肚菌 5 d 时,编码 *Ste11* (68323698、68329991)、*Ssk2* 和 *Ssk22* (68326022)、*HOG1* (68330809) 的基因上调表达。因此,白霉病菌感染羊肚菌 5 d 时,HOG-MAPK 信号通路被激活,羊肚菌子实体细胞通过合成并积累大量的甘油,以应对

外界渗透压的变化,进而维持正常生理代谢。*Hog1* 基因作为该通路的核心组分,推测其在羊肚菌响应白霉病菌侵染的过程中发挥关键作用。

此外,本研究克隆获得羊肚菌 *Hog1* 类型 MAPK 基因 *Mshog1*,通过基因结构鉴定发现其属于 *PKc-like* 基因家族,*Mshog1* 蛋白的开放阅读框(ORF)为 1 050 bp,其与其他 HOG1 同源蛋白具有相似的“TGY”双重磷酸化位点。“TGY”活性域是逆境胁迫激活的 MAPK 蛋白激酶中的关键功能区域,在细胞应对环境压力的信号转导中起重要作用^[26-27]。

3.2 糖酵解(Glycolysis)

糖酵解是细胞能量代谢的核心途径,由其产生的丙酮酸在糖代谢、脂代谢与氨基酸代谢之间扮演着关键枢纽的角色^[28]。糖酵解过程包括 10 个生化反应,分为 2 个阶段:前 5 个生化反应为第 1 阶段,后 5 个生化反应为第 2 阶段,是产生 ATP 的储能阶段^[29]。丙酮酸作为生物代谢途径的重要中间产物,在代谢过程中起着枢纽作用,作为糖酵解的最终生成物质,不仅搭建起糖酵解与三羧酸循环之间的桥梁,还是蛋白质、脂肪和碳水化合物降解等代谢过程中不可或缺的中间分子。生物体中好氧呼吸、厌氧发酵等诸多产能代谢过程,都需要先形成丙酮酸,随后才能进入特定代谢途径。细胞内部的各类代谢路径更是通过丙酮酸实现相互关联,由此可见丙酮酸在生物体内的重要地位^[30]。王倩等^[31]研究发现,双孢蘑菇耐高温菌株 A15-TH 菌丝生长速度高于工厂化菌株 A15,并且在高温胁迫下己糖激酶和丙酮酸激酶活性增加,表明糖酵解途径加快。Yan 等^[32]研究发现,热胁迫会促进平菇体内不饱和脂肪酸与核苷酸降解,氨基酸含量和维生素含量提高,糖酵解过程与三羧酸循环过程加速,进而影响平菇菌丝的代谢活动。本研究在糖酵解/糖异生途径中共筛选出 12 个差异表达基因,除磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 *PEPCK*(68322318)表达量上调外,其余差异表达基因表达量均下调。这说明白霉病原菌侵染能抑制羊肚菌中丙酮酸生成,进而导致羊肚菌生长和发育过程受到抑制。因此,糖酵解途径在羊肚菌维持生长代谢与逆境抗性方面发挥了重要作用。

4 结论

本研究采用高通量测序技术对羊肚菌感染长孢假单胞菌前及感染后 3 d 和 5 d 的转录组数据进行

检测分析,发现差异表达基因主要参与 DNA 整合、代谢过程、氧化还原反应等生物过程,以及糖酵解、MAPK 信号通路等关键代谢通路。通过 qRT-PCR 对随机选取的差异表达基因进行验证,其表达趋势与 RNA-seq 测序结果一致,说明本研究转录组数据可靠。进一步对候选关键基因 *Mshog1* 进行克隆和序列分析,确认了其结构特征,*Mshog1* 蛋白与其他真菌 HOG1 蛋白的相似度均在 97.00% 以上,且具有“TGY”双重磷酸化位点。

参考文献:

- [1] HIBBETT D S, BINDER M, BISCHOFF J F, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi[J]. *Mycological Research*, 2007, 111(5): 509-547.
- [2] MCKELLAR R L, KOHRMAN R E. Amino acid composition of the morel mushroom[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1975, 23(3): 464-467.
- [3] 李卫东. 羊肚菌生物活性成分及药理作用的研究进展综述[J]. *食药用菌*, 2018, 26(3): 157-160.
- [4] 赵琪. 我国羊肚菌产业发展现状、前景及建议[J]. *食药用菌*, 2018, 26(3): 148-151, 156.
- [5] 刘伟, 张亚, 蔡英丽. 我国羊肚菌产业发展的现状及趋势[J]. *食药用菌*, 2017, 25(2): 77-83.
- [6] 刘伟, 蔡英丽, 何培新, 等. 羊肚菌栽培的病虫害发生规律及防控措施[J]. *食用菌学报*, 2019, 26(2): 128-134, 3-5.
- [7] SUN J Z, YU S, LU Y Z, et al. Proposal of a new family Pseudodiplosporeaceae fam. nov. (Hypocreales) based on phylogeny of *Diplospora longispora* and *Paecilomyces penicillatus*[J]. *Mycology*, 2022, 14(1): 60-73.
- [8] YU Y, TAN H, LIU T H, et al. Dual RNA-seq analysis of the interaction between edible fungus *Morchella sextelata* and its pathogenic fungus *Paecilomyces penicillatus* uncovers the candidate defense and pathogenic factors[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 760444.
- [9] WANG S R, WANG J Y, WANG T Y, et al. Integrated transcriptomics-proteomics analysis reveals the response mechanism of *Morchella sextelata* to *Pseudodiplospora longispora* infection[J]. *Journal of Fungi*, 2024, 10(9): 604.
- [10] CHEN C, FU R T, WANG J, et al. Genome sequence and transcriptome profiles of pathogenic fungus *Paecilomyces penicillatus* reveal its interactions with edible fungus *Morchella importuna*[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 2607-2617.
- [11] YANG C, JIANG X L, MA L, et al. Transcriptomic and metabolomic profiles provide insights into the red-stipe symptom of morel fruiting bodies[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(3): 373.
- [12] YANG X M, YANG K X, WANG X H, et al. Transcriptomic analysis reveals the mechanism of bacterial disease resistance of

- postharvest button mushroom (*Agaricus bisporus*) [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2022, 122: 101903.
- [13] BAILEY A M, COLLOPY P D, THOMAS D J, et al. Transcriptomic analysis of the interactions between *Agaricus bisporus* and *Leucanicillium fungicola* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 55: 67-76.
- [14] 许机分, 陈泓妃, 王娜, 等. 真菌 Hog1 MAPK 信号通路研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2022, 38(11): 32-40.
- [15] 吴雪兰, 郝海波, 黄建春, 等. CWI 和 HOG 信号通路基因在斑玉蕈不同发育阶段的表达模式 [J]. *菌物学报*, 2021, 40(6): 1388-1399.
- [16] 解凡, 赵丽丽, 叶丽云, 等. 肺形侧耳低温胁迫时期的转录组分析 [J]. *菌物学报*, 2018, 37(12): 1598-1607.
- [17] 徐岩岩. 托拉斯假单胞杆菌感染平菇传播途径及其弱毒菌株诱导抗病机理研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [18] XIA H X, LI X L, HE Y R, et al. The FvHOG1 pathway is essential for stress responses, fungicide resistance, fumonisin B1 production and pathogenesis in *Fusarium verticillioides* [J]. *Crop Health*, 2025, 3(1): 14.
- [19] 苏文英, 刘晓梅, 纪伟, 等. 羊肚菌白霉病原鉴定及生物学特性研究 [J]. *浙江农业科学*, 2023, 64(1): 204-208.
- [20] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290-295.
- [21] LIAO Y, SMYTH G K, SHI W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923-930.
- [22] 边银丙. 食用菌菌丝体侵染性病害与竞争性病害研究进展 [J]. *食用菌学报*, 2013, 20(2): 1-7.
- [23] 张鑫苗, 伍国强, 魏明. MAPK 在植物响应逆境胁迫中的作用 [J]. *草业学报*, 2024, 33(1): 182-197.
- [24] HOHMANN S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(2): 300-372.
- [25] GUSTIN M C, ALBERTYN J, ALEXANDER M, et al. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(4): 1264-1300.
- [26] ALONSO-MONGE R, NAVARRO-GARCÍA F, MOLERO G, et al. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(10): 3058-3068.
- [27] LAWRENCE C L, BOTTING C H, ANTROBUS R, et al. Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast; regulating adaptation to citric acid stress [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(8): 3307-3323.
- [28] 牛屹帆, 董婷婷, 李杏泽, 等. 丙酮酸生物代谢途径及代谢控制的研究进展 [J]. *环境化学*, 2025, 44(4): 1195-1204.
- [29] CHANDEL N S. Glycolysis [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2021, 13(5): a040535.
- [30] YANG M H, ZHANG X. Construction of pyruvate producing strain with intact pyruvate dehydrogenase and genome-wide transcription analysis [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33(3): 59.
- [31] 王倩, 黄建春, 卜乐男, 等. 双孢蘑菇对高温胁迫的响应及耐热机理 [J]. *菌物学报*, 2021, 40(6): 1400-1412.
- [32] YAN Z Y, ZHAO M R, WU X L, et al. Metabolic response of *Pleurotus ostreatus* to continuous heat stress [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3148.

(责任编辑: 石春林)