



香菇 HMG-box 转录因子 *lelcrp1* 基因的功能

胡悦, 蔡英丽, 喻晶晶, 周雁, 李军平, 边银丙, 龚钰华*

华中农业大学植物科学技术学院应用真菌研究所, 湖北 武汉 430070

摘要:【目的】研究香菇(*Lentinula edodes*) HMG-box 转录因子 LELCRP1 (*Lentinula edodes* lignocellulase genes regulation protein 1)在木质纤维素降解相关酶基因表达中的功能与作用。【方法】通过 double-joint 及同源重组方法构建 *lelcrp1* 基因 RNAi 载体, 采用根癌农杆菌介导转化的方法转入香菇异核菌株 W1 菌丝中, 筛选得到 RNAi 转化子, 通过 Southern 杂交检测插入片段在菌株 W1 基因组中的拷贝数量。采用荧光定量 PCR 检测 RNAi 转化子木质纤维素降解酶基因表达水平变化, 并在含有 3.5 μg/mL 潮霉素的 MYG 平板上测定 RNAi 转化子的菌丝生长速度。【结果】获得了 4 个 *lelcrp1* 基因表达水平与出发菌株 W1 相比显著下调 6–7 倍的 RNAi 转化子。Southern 杂交结果显示, *lelcrp1* 基因 RNAi 片段已成功整合至香菇菌株 W1 基因组内, 并以单拷贝形式存在。对其中 2 个 RNAi 转化子的 26 个木质纤维素降解酶基因表达水平进行分析, 发现其中 9 个纤维素酶基因、1 个半纤维素酶基因、2 个辅助酶 AA9 基因和 1 个锰过氧化物酶基因的表达水平均表现出明显的下调。平板生长试验表明, RNAi 转化子菌丝生长速度均显著慢于出发菌株 W1。【结论】通过 RNAi 技术成功抑制了香菇异核菌株中 *lelcrp1* 基因表达水平, 并导致部分纤维素及木质素酶基因表达水平相应下调, 首次发现 HMG-box 结构域的转录因子能调控木质纤维素降解相关酶基因表达。

关键词: 香菇, HMG-box 转录因子, 木质纤维素酶基因, 表达调控, RNAi

香菇(*Lentinula edodes*)是我国主要的人工栽培食用菌之一, 目前主要采用栎木屑为栽培原料, 但栽培料中干物质转化利用率较低, 且尚未普遍采用秸秆作为栽培原料^[1]。深入研究香菇对栽培基质中木质纤维素降解的分子机制, 对提高栽培基质转化利用率, 拓展栽培基质种类均具有重要的

意义。

香菇作为一种典型的白腐真菌, 主要通过分泌到胞外的木质纤维素酶降解纤维素。真菌木质纤维素酶活与相应酶基因的表达具有一致性, 提高真菌胞外木质纤维素相关酶基因表达水平有利于促进栽培基质有效利用。真菌木质纤维素酶基

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201503137); 湖北省技术创新重大项目(2016ABA100)

*通信作者。Tel/Fax: +86-27-87282221; E-mail: gongyuhua@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2017-12-26; 修回日期: 2018-01-29; 网络出版日期: 2018-03-21

因的表达受多种转录因子调控, 目前已鉴定的参与调控纤维素酶基因、半纤维素酶基因转录的正调控因子有 Xyr1、Ace2、Hap2/3/5、ClrB, 负调控因子有 Ace1、Cre1, 这些转录因子主要存在于丝状真菌中^[2]。在白腐真菌中仅有少数与木质纤维素酶基因表达相关的转录因子已经被报道, 但功能尚不明确^[3]。

高迁移率蛋白家族(HMG)是染色质的组成蛋白, 通常具有 1-7 个 HMG-box 结构域, 具有单个结构域的蛋白可与特异性 DNA 结合, 而具有多个 HMG-box 结构域的蛋白则表现出与 DNA 的非特异性结合^[4]。在已报道的真菌中, 结合非特异性 DNA 的 HMG 蛋白包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) Hmo1p 和 Hmo2p^[5-6], Abf2p^[7]和 Nhp6Ap/Nhp6Bp^[8], 粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) Hmo1^[9]及柄孢霉 (*Podospora anserina*) mtHMG1^[10]。Ohm 等研究发现, 裂褶菌(*Schizophyllum commune*)具有 HMG-box 结构域的转录因子 *hom1* 和 *hom2*, 与菌丝生长及子实体形成具有重要关系, 敲除 *hom1* 后可以形成数量较多但个体较小的子实体, 敲除 *hom2* 后则子实体不能发育; 此外, 裂褶菌野生型菌落形态为非对称型, 而敲除 *hom2* 后菌落形态变为对称型, 表明 *hom2* 对裂褶菌菌落形态也有明显的调控作用^[11]。施乐乐等对金针菇(*Flammulina velutipes*) *fvhom1* 基因进行过表达后, 发现菌丝生长速度明显减缓^[12]。由此可见, 这类含有 HMG-box 结构域的转录因子具有调控真菌菌丝生长和子实体形成的重要功能, 但关于其调控木质纤维素降解相关酶基因表达的研究却鲜有报道。

前期通过以纤维素、纤维素+木质素磺酸钠及葡萄糖为主要碳源培养的香菇菌丝转录组(数据

暂未公开)和分泌蛋白组^[13]比较分析, 发现 CAZy 酶家族 GH3、GH5、GH6、GH7、GH10、GH12、AA9 及木质素降解酶相关部分基因或蛋白受纤维素+木质素磺酸钠诱导表达, 且与香菇 HMG-box 型转录因子 *lelcrp1* (*Lentinula edodes* lignocellulase genes regulation protein)表达模式一致。在此基础上, 本文通过 RNAi 方法进行 *lelcrp1* 基因沉默, 并通过检测香菇与木质纤维素降解相关酶基因的表达水平变化, 分析 *lelcrp1* 的基因功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:香菇异核体菌株“武香一号”W1 (ACCC 50926)、载体质粒 pCAMBIA1300-g 均由本实验室保藏并提供;大肠杆菌菌株 DH5 α 、农杆菌菌株 AGL1 均购自上海唯地生物技术有限公司。

1.1.2 培养基及试剂:MM 培养基、IM 培养基和 Co-IM 培养基配方参考[14], LB 和 MYG 等常规培养基配方参考[15]。Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase、ClonExpress Multis One Step Cloning Kit、HiScript II One Step RT-PCR Kit 和 AceQTM Qpcr SYBR Green Master Mix 购自 Vazyme 公司, 限制性内切酶 *Kpn* I、*EcoR* I、*BamH* I 和 *Xho* I 购自 Thermo Scientific 公司, San Prep 柱式 DNA 回收试剂盒和真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司, RNAiso Plus 购自 TaKaRa 公司。

1.2 LEHMO1 蛋白结构分析

基于本实验室香菇单核体基因组测序^[16]数据, 通过网站 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/S-structure/cdd/wrpsb.cgi> 对 LELCRP1 蛋白的结构域进行分析, 蛋白结构图使用 IBS 软件进行绘制^[17]。

1.3 *lelcrp1* 基因沉默载体构建

以 W1 单核体 DNA 及异核体 cDNA 为模板, 分别对 GPD 启动子和 *lelcrp1* 基因 antisense 片段进行扩增, 用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco*R I 对质粒 pCAMBIA1300-g 进行双酶切, 回收扩增片段和酶切大片段, 通过 double-joint^[18]和同源重组构建 *lelcrp1* 基因沉默载体 pCAMBIA1300-g-*lelcrp1*。

1.4 遗传转化体系构建及转化子筛选

将含有重组质粒 pCAMBIA1300-g-*lelcrp1* 的农杆菌 AGL1 划线培养 1 d, 挑取单菌落于 1 mL LB (50 µg/mL Rif⁺, 50 µg/mL Kan⁺)培养液中, 200 r/min 28 °C 培养 1 d。取 1 mL 农杆菌菌液加入到 100 mL MM (50 µg/mL Kan⁺)液体培养基, 200 r/min 28 °C 培养 2 d。收集菌液, 5000 r/min 离心 10 min, 去上清后, 用等体积 IM 培养液重悬, 并用 IM 稀释至 OD₆₀₀=0.4, 添加乙酰丁香酮(AS)至终浓度为 200 µmol/L, 于 200 r/min 28 °C 培养 9 h 至 OD₆₀₀=0.6。用打孔器打取直径相同的已活化 W1 菌块浸入上述 IM 农杆菌菌液, 20 min 后转入含有 200 µmol/L AS 的 Co-IM 培养基, 25 °C 正置培养, 3 d 后用无菌水冲洗菌丝 3 次, 浸入含有 400 µg/mL 头孢噻肟霉素的无菌水中, 20 min 后转入含有 3.5 µg/mL 潮霉素和 400 µg/mL 头孢噻肟霉素的 MYG 培养基上, 25 °C 培养。菌丝萌发后, 在含有 3.5 µg/mL 潮霉素 MYG 平板上对转化子进行筛选, 利用微波法^[19]提取菌丝总 DNA, 通过启动子与 antisense 片段的扩增和实时荧光定量 PCR 检测 *lelcrp1* 基因表达水平鉴定阳性转化子。PCR 上游引物为 *gpd-ys-F*: 5'-TTGCCTCTAATCCCTTGCTA-3', 下游引物为 *lelcrp1-anti-R* 5'-CGAGGCTCCGCTCACTGTTT-3, 荧光定量 PCR 引物为 *lelcrp1-RT-F* 和 *lelcrp1-RT-R* (表 1)。

表 1. 实时荧光定量 PCR 引物列表

Table 1. List of Real-time fluorescence quantitative PCR primers

Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>lelcrp1-RT-F</i>	CAAGGACGGGAAGGCGAGAA
<i>lelcrp1-RT-R</i>	GAGGAGCGACGACGAACGAC
LE01Gene04541-RT-F	CTGCCCCACCGTTGCATCAGCCCT
LE01Gene04541-RT-R	TCAAAGTAGACGACTGATTACCCAC
LE01Gene08136-RT-F	TTCCGTGTTACGTTCTTGATGG
LE01Gene08136-RT-R	CATAATTGGGCTGTGAGGATGG
LE01Gene12864-RT-F	GGCTTGAACGGTGCCCTTTAT
LE01Gene12864-RT-R	TGGACATTGGGAGTCGACAGTAG
LE01Gene04089-RT-F	TGGTCTCGTTCTCAGTATTTGG
LE01Gene04089-RT-R	GCTGGAGGTAGTAGTGCCCGTA
LE01Gene04829-RT-F	TCTGGGACGATTACGCTGTGAA
LE01Gene04829-RT-R	CGTGGATGTGGCAGAGGAAGTA
LE01Gene07961-RT-F	TTTCCGCCATTCGTCGGTTGTA
LE01Gene07961-RT-R	GTGGTTCGCTCAGTCGGGTAGG
LE01Gene10050-RT-F	AAGGTGATCCCACTACGACGAG
LE01Gene10050-RT-R	TACCAAACGATAGAATCAATCAAG
LE01Gene10512-RT-F	CTTCAGGCTCCGTCCTTTAT
LE01Gene10512-RT-R	ATCCAGATGCTCATTTCTTTTCAG
LE01Gene10634-RT-F	CTGCCGTCGTATGGAGTGGTT
LE01Gene10634-RT-R	TGTGCGGAATAATCGGTTGTG
LE01Gene07574-RT-F	TGATTTGGTTCTCGCTGTTGC
LE01Gene07574-RT-R	CGTCTGAGGGATTCCATTTCG
LE01Gene10266-RT-F	TCAACTCAAGCGACAAATACC
LE01Gene10266-RT-R	CAGAATAAGCACCTGGGAAAGC
LE01Gene09248-RT-F	TCCCATTCAGGATGCCACAG
LE01Gene09248-RT-R	TTGATTCAGTACGCGGTGA
LE01Gene11039-RT-F	TCTCACTGGCTCCGCTTCAACCT
LE01Gene11039-RT-R	CAGCCGCTTCCGCTCTTTCAATA
LE01Gene12502-RT-F	TACTTATGTTGCGGACCCCTTCTT
LE01Gene12502-RT-R	AGCCTTGTTCCAAACCGAGTGA
LE01Gene13053-RT-F	ACCGATTCATCGCACAGCAAG
LE01Gene13053-RT-R	GTTAGGTTCTGTTATCAAAGGCAAA
LE01Gene03223-RT-F	CTCGACAAGGCAACTCACA
LE01Gene03223-RT-R	ATCTCCAGGTTCCATCGTCA
LE01Gene07975-RT-F	GATTCATTCAGTATTTCGCCTTGC
LE01Gene07975-RT-R	TCCCAGATGCTGTTTCTTTT
LE01Gene07762-RT-F	CTGGAGCCAACAATATTACGC
LE01Gene07762-RT-R	TCGGGAACAGCTACACTATCACTT
LE01Gene00726-RT-F	CGCAATGAGCAATGGAAGAAGAC
LE01Gene00726-RT-R	CAGCGAATGAACAATGGACATACAA
LE01Gene05156-RT-F	GCACAATTACACCGACACGC
LE01Gene05156-RT-R	AAGTATCCGAGCCGAACGAG
LE01Gene09060-RT-F	CTGGACGACCGAATGCTACTGC
LE01Gene09060-RT-R	CTGCGAGTCGAAAAGTGAAGGGA
LE01Gene08997-RT-F	CAGCGTGTCTGATGTCTTGATG
LE01Gene08997-RT-R	AGGAAATGACGAGGAAGCGAAT
LE01Gene04737-RT-F	ATCCGACCAGGAATTGAACCA
LE01Gene04737-RT-R	GCAGTAACCAGAGATTGAGGG
LE01Gene04660-RT-F	AACACTGAGAATCCCAATAAGCG
LE01Gene04660-RT-R	GCCATCACAGTAGCGAGACCAG
LE01Gene04648-RT-F	GCATCCCTTCCACCTCCAT
LE01Gene04648-RT-R	CGGGCACAACCTCAGTCCAG
LE01Gene02092-RT-F	GAGGAACTCACGAGGAAACACC
LE01Gene02092-RT-R	TGATTATTGGCTACGATGAACAC

1.5 荧光定量 PCR 检测

将转化子接种于铺有一层无菌玻璃纸并含有 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的 MYG 平板上, 出发菌株 W1 接种于铺有一层无菌玻璃纸的 MYG 平板, 分别置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 10 d 后, 收集菌丝立即置于液氮冷却的研钵中进行研磨, 研磨后的菌丝粉末立即进行 RNA 提取, 未使用的菌丝粉末样品-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。样品总 RNA 提取使用 Trizol plus (TaKaRa, Japan) 试剂方法, cDNA 的合成采用 HiScript II One Step RT-PCR Kit (Vazyme, China) 试剂盒。根据目标基因在香菇基因组数据库中的 CDS 序列设计合成荧光定量 PCR 引物(表 1)。实时荧光定量 PCR 采用 AceQTM qPCR SYBR Green Master Mix (TaKaRa, Japan) 在 BIO-RAD CFX Connect Real-Time System (USA) 上按照 Vazyme 的 qPCR 实验操作手册进行, 以 *leactin* 为内参基因, W1 cDNA 为对照。

1.6 菌丝长速测定

将转化子接种于含有 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的 MYG 平板上, 每一菌株平板接种菌块设 5 个重复, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。采用十字交叉法^[20]记录菌丝生长速度: 待菌丝开始萌发, 以菌块中心为交点划十字并测量菌丝尖端直径 r , 待长速最快的菌丝即将长满平板时, 测定菌落直径 R , 记菌丝生长天数为 n , 计算生长速率。菌丝日平均生长速度按照公式(1)计算。

$$v=(R-r)/2n \quad \text{公式(1)}$$

1.7 Southern 杂交分析

将转化子接种于含有 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的 MYG 平板上, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 采用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(生工生物工程, 上海)提取高纯度 DNA, 用限制性内切酶 *BamH* I 对基因组 DNA 进行酶切, 以 hpt557-F (5'-ACACTA CATGGCGTGATTTTCAT-3')和 hpt557-R (5'-TC CACTATCGGCGAGTACTTCT-3')为引物扩增 *hyg* 基因片段作为探针标记, 通过酶切产物和探针的杂交结果, 判断外源基因片段在香菇基因组中拷贝数^[21]。

2 结果和分析

2.1 LELCRP1 蛋白结构分析

以香菇单核体全基因组测序数据为基础, 将 LELCRP1 蛋白序列提交至 NCBI Conserved Domain Search, 分析 LELCRP1 蛋白的结构域组成(图 1); LELCRP1 蛋白包含 532 个 AA, 有 1 个 Ashwin super family 结构域(23-113)和 1 个 HMG-box super family 结构域(124-206), 后者具有 HMG-box 型转录因子典型的 DNA-binding 区域。

2.2 基因沉默载体构建

以 pCAMBIA1300 质粒为载体骨架, 通过 double-joint 法连接 GPD 启动子(1017 bp)及 *lelcrp1*

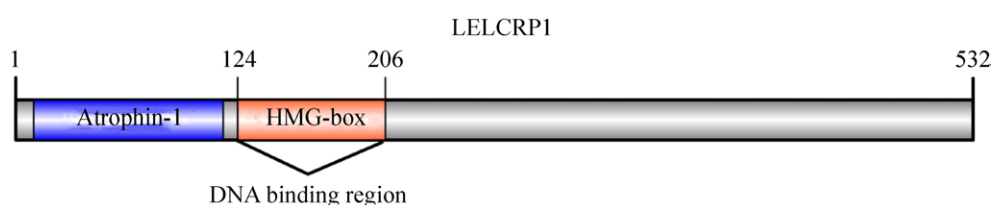


图 1. LELCRP1 蛋白功能结构域

Figure 1. Functional motif of LELCRP1.

基因 antisense 片段(483 bp),利用同源重组法连接片段与线性化载体,转化 *E. coli* DH5 α ,通过菌落 PCR 选择阳性克隆子(图 2-A),同时提取质粒用限制性内切酶 *Xho* I 进行酶切电泳(图 2-B)和扩增片段回收测序(P2 通用引物反向测序),检测载体构建的正确性。菌落 PCR、质粒酶切以及测序结果均表明构建 *lelcrp1* 基因的沉默载体成功。

2.3 菌丝转化及转化子筛选

在含有 3.5 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的 MYG 平板上经过 4 次筛选 得到了 30 个较为稳定的抗性转化子,微波法提取菌丝基因组总 DNA。以 *gpd-ys-F* (GPD 启动子 717 bp)和 *lelcrp1-anti-R* (antisense 片段

483 bp)为引物对其进行特异性扩增(图 3-A),PCR 产物经凝胶电泳检测,确认得到大小约为 1200 bp 的 GPD 启动子与 *lelcrp1* 基因 antisense 相连的片段,可以初步判定这些转化子为阳性转化子。

随机挑选其中 10 个转化子,在含有 3.5 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的 MYG 玻璃纸平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 10 d 后,提取总 RNA,反转录为 cDNA,以 *lelcrp1-RT-F*

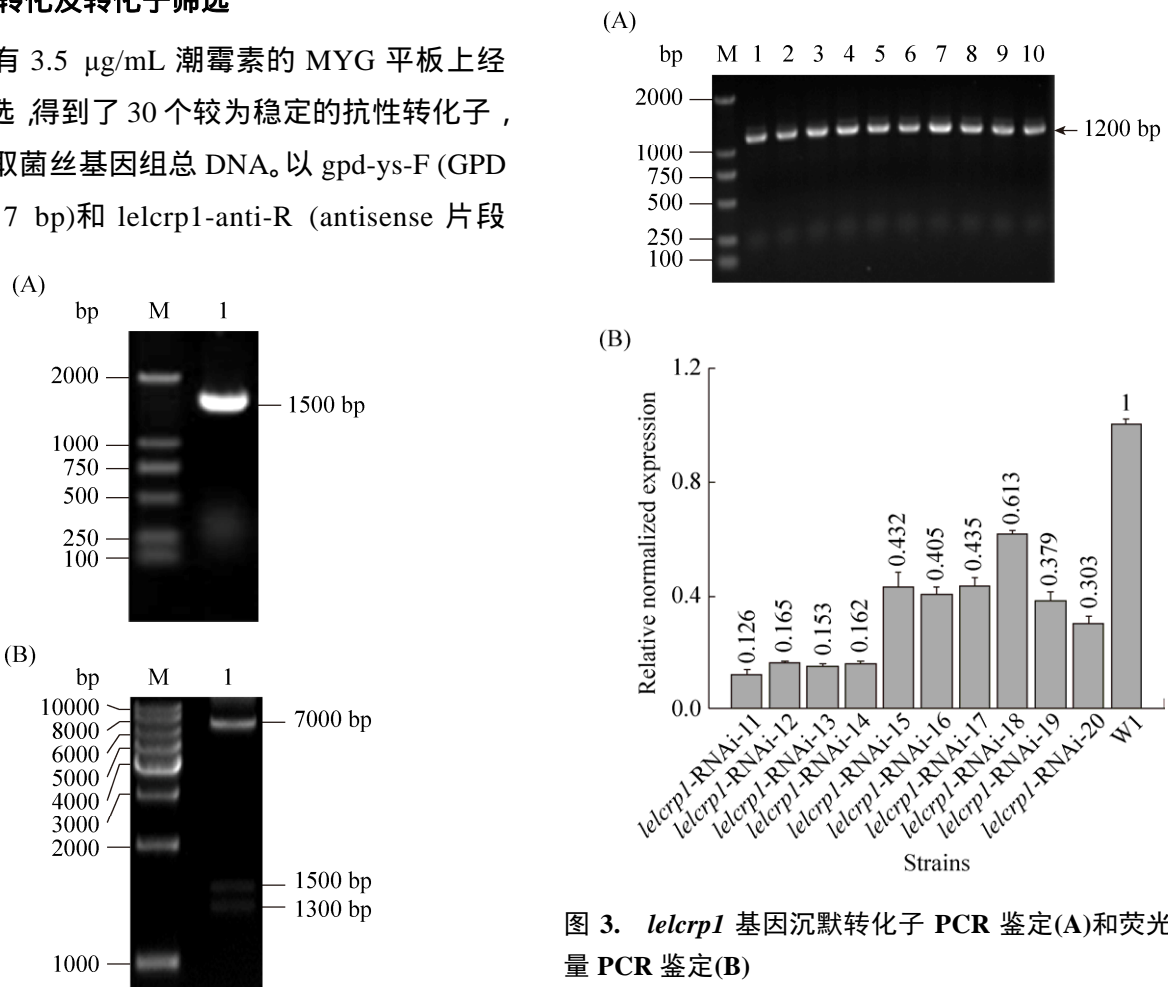


图 3. *lelcrp1* 基因沉默转化子 PCR 鉴定(A)和荧光定量 PCR 鉴定(B)

Figure 3. PCR identification (A) and fluorescence quantitative PCR identification (B) of *lelcrp1* silencing transformants. A: M: DL2000 marker; lane 1–10: Transformants *lelcrp1*-RNAi-11, *lelcrp1*-RNAi-12, *lelcrp1*-RNAi-13, *lelcrp1*-RNAi-14, *lelcrp1*-RNAi-15, *lelcrp1*-RNAi-16, *lelcrp1*-RNAi-17, *lelcrp1*-RNAi-18, *lelcrp1*-RNAi-19, *lelcrp1*-RNAi-20. B: Target strains: *lelcrp1*-RNAi-11–20; CK: W1.

图 2. 重组质粒 pCAMBIA1300-g-*lelcrp1* 的菌落 PCR 鉴定(A)和酶切鉴定(B)

Figure 2. Amplification (A) and digestion (B) of pCAMBIA1300-g-*lelcrp1* cloning. A: M: DL2000 marker; lane 1: amplification of pCAMBIA1300-g-*lelcrp1* cloning. B: M: 1 kb DNA ladder; lane 1: pCAMBIA1300-g-*lelcrp1* cloning digested by *Xho* I.

和 *lelcrp1*-RT-R 为引物, 采用荧光定量 PCR 技术检测 *lelcrp1* 基因在出发菌株 W1 以及转化子中的表达情况(图 3-B)。结果显示, 4 个转化子 *lelcrp1*-RNAi-11、*lelcrp1*-RNAi-12、*lelcrp1*-RNAi-13 和 *lelcrp1*-RNAi-14 中 *lelcrp1* 基因的表达量与出发菌株相比分别下降至出发菌株的 12.6%、16.5%、15.3% 和 16.2%, 表明 *lelcrp1* 基因表达在这 4 个转化子中已成功受到干扰。

2.4 转化子木质纤维素降解相关酶基因表达水平分析

在得到的 4 个沉默子中挑选 *lelcrp1* 基因下调倍数最高的 2 个转化子 *lelcrp1*-RNAi-11 和 *lelcrp1*-RNAi-13, 分别提取总 RNA, 以反转录后 cDNA 为模板, 采用荧光定量 PCR 技术检测部分木质纤维素降解相关酶基因在出发菌株 W1 以及 RNAi 转化子中的表达情况(表 2)。结果显示, 在

表 2. *lelcrp1* 沉默转化子木质纤维素降解相关酶基因表达水平

Table 2. Expression level of ligocellulose degradation related enzymes in *lelcrp1* silencing transformants

Gene ID	Gene family	Protein name	Relative quantification		
			W1(CK)	<i>lelcrp1</i> -RNAi-11	<i>lelcrp1</i> -RNAi-13
Cellulase					
LE01Gene04541	GH12	Endo- β -1,4-glucanase	1	-66.1302	-42.9299
LE01Gene08136	GH5	Endo- β -1,4-glucanase	1	-71.4921	-13.9492
LE01Gene11039	GH5	Glucan 1,3- β -glucosidase	1	-1.6222	-1.6050
LE01Gene12502	GH5	Glucan 1,3- β -glucosidase D	1	-1.2537	-1.2874
LE01Gene13053	GH5	Glucan 1,3- β -glucosidase D	1	-1.2400	-1.0985
LE01Gene12864	GH7	Cellobiohydrolase I	1	-3.3638	-12.4348
LE01Gene04089	GH7	Cellobiohydrolase I	1	-8.4766	-6.3056
LE01Gene04829	GH7	Cellobiohydrolase I	1	-62.1094	-38.2943
LE01Gene07961	GH7	Cellobiohydrolase I	1	-38.0010	-20.4303
LE01Gene10050	GH6	Cellobiohydrolase II	1	-33.7429	-25.1632
LE01Gene10512	GH3	β -glucosidase	1	-1.8679	-6.1688
LE01Gene10634	GH3	β -glucosidase	1	-34.7739	-32.6943
LE01Gene07574	GH3	β -glucosidase	1	-1.0480	-2.0516
LE01Gene10266	AA9	Lytic polysaccharide monooxygenase	1	-98.0890	-39.8429
LE01Gene09248	AA9	Lytic polysaccharide monooxygenase	1	-29.5640	-45.0966
Hemicellulase					
LE01Gene03223	GH10	Endo-1,4- β -xylanase	1	-21.1862	-17.7635
LE01Gene07975	GH10	Endo-1,4- β -xylanase	1	-1.1700	-1.9892
LE01Gene07762	GH5	Mannan endo-1,4- β -mannosidase	1	1.9330	-1.0001
LE01Gene00726	GH5	Mannan endo-1,4- β -mannosidase	1	-1.2647	1.1469
LE01Gene05156	GH3	Exo-1,4- β -xylosidase	1	-1.1410	-3.2034
Lignin degrading protein					
LE01Gene09060	AA2	Manganese peroxidase	1	-24.0394	-104.0387
LE01Gene08997	AA2	Manganese peroxidase	1	-2.1837	-1.9860
LE01Gene04737	AA1	LACC 13	1	-1.2489	-1.6775
LE01Gene04660	AA1	LACC 14	1	-2.2591	-2.3978
LE01Gene04648	AA1	LACC 9	1	-2.8776	-2.7648
LE01Gene02092	AA5	Glyoxal oxidase	1	-1.8333	-2.9474

* $P < 0.01$ and relative expression fold 4 represent significant difference.

检测的 26 个木质纤维素降解相关酶基因中, 有 9 个纤维素酶基因、1 个半纤维素酶基因、2 个辅助酶 AA9 基因和 1 个锰过氧化物酶基因的表达水平在这 2 个 RNAi 转化子中均呈现明显的下调趋势, 另外 13 个酶基因表达则无明显变化。表明香菇异核菌株中 *lelcrp1* 基因的沉默影响了部分木质纤维素降解相关酶基因的表达水平, 且对纤维素酶和锰过氧化物酶基因表达水平的影响较为显著。

2.5 转化子菌丝生长速度测定

在含有 3.5 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的 MYG 平板上, 采用十字交叉法对 4 个沉默转化子的菌丝生长速度进行测量, 用 Microsoft Excel 2010 软件进行数据处理和单因素方差分析($\alpha=0.05$), 结果表明, 转化子菌丝生长速度与出发香菇菌株 W1 相比具有显著性差异, 转化子菌丝生长速度显著慢于 W1 (表 3)。

2.6 Southern 杂交分析结果

以 hpt557-F 和 hpt557-R 为引物扩增 *hyg* 基因片段作为探针标记, 以经限制性内切酶 *Bam*H I 酶切后的转化子基因组 DNA 为模板, Southern 杂交结果显示, 探针与出发菌株 W1 的酶切产物杂交无条带, 而在受测的 4 个转化子中各出现一条带

(图 4), 表明外源插入性 *lelcrp1* 基因片段在香菇 W1 中以单拷贝的形式存在。

3 讨论

本研究采用根癌农杆菌介导转化法, 获得了转录因子 *lelcrp1* 基因的 4 个沉默转化子, 首次在香菇异核体菌株中对一个内源性 HMG-box 型转录因子 *lelcrp1* 实现了基因表达干扰。*lelcrp1* 基因沉默子中多个木质纤维素酶基因表达水平出现了下降, 而其所编码蛋白均为参与木质纤维素降解的重要蛋白^[13], 表明 *lelcrp1* 基因的表达变化影响了多个香菇木质纤维素降解相关酶基因的表达。LELCRP1 蛋白中包含有 DNA 结合结构域, 表明 *lelcrp1* 基因通过转录调控方式控制木质纤维素降解相关酶基因的表达。首次发现 HMG-box 结构域的转录因子能调控木质纤维素降解相关酶基因表达。

迄今为止, 虽然子囊菌纤维素酶、半纤维素酶基因的表达调控得到了广泛研究, 但白腐真菌调控木质纤维素降解相关酶基因的转录因子却鲜有研究报道。前人研究表明, 不论是转录因子家族还是单个转录因子, 在子囊菌和担子菌这两类真菌中都具有较大的差异, 担子菌中仅少数转录

表 3. *lelcrp1* 沉默转化子及出发菌株菌丝生长速度差异显著性分析

Table 3. Significant analysis of the mycelial growth rate of *lelcrp1* silencing transformants and the original strain

Strain	repetitions of hyphal average daily growth rate/mm					Average growth rate/mm	Error range/mm	P-value
	1	2	3	4	5			
W1	4.6375	4.6875	4.9375	4.8075	4.8725	4.7540	± 0.1835	
<i>lelcrp1</i> -RNAi-11	4.4925	4.4525	4.6350	4.8100	4.7425	4.6265	± 0.1835	0.03
<i>lelcrp1</i> -RNAi-12	4.4525	4.6000	4.5750	4.5950	4.7525	4.5950	± 0.1575	0.02
<i>lelcrp1</i> -RNAi-13	4.4800	4.4850	4.4800	4.1850	4.4400	4.4140	± 0.2290	0.01
<i>lelcrp1</i> -RNAi-14	4.3850	4.3375	4.5750	4.6200	4.2150	4.4265	± 0.2115	0.01

* $P < 0.05$ represent significant difference.

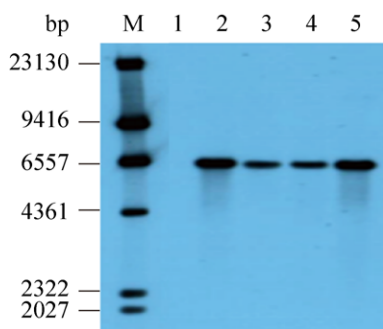


图 4. *lelcrp1* 基因沉默转化子 Southern 杂交

Figure 4. Southern blotting of *lelcrp1* silencing transformants. M: DNA-*Hind* III; lane 1–5: W1, *lelcrp1*-RNAi-11, *lelcrp1*-RNAi-12, *lelcrp1*-RNAi-13, *lelcrp1*-RNAi-14.

因子与子囊菌具有同源性^[22],担子菌相关转录因子研究仍然处于起步阶段。本文报道了在转录水平上调控多个木质纤维素相关酶基因表达的新型转录因子,这对香菇及其他担子菌相关转录因子的深入研究具有重要意义。

本研究通过农杆菌介导 *lelcrp1* 基因沉默片段转化香菇菌株 W1 后,插入片段以单拷贝形式存在,可以确定 4 个 *lehmo1* 基因沉默子中 *lelcrp1* 基因片段已经成功整合到了香菇基因组中。本研究同时也发现 *lelcrp1* 基因沉默子的菌丝生长速度比出发菌株慢,这一结果与 Saloheimo 等在红褐肉座菌(*H. jecorina*)敲除 *ace1* 基因导致菌丝在纤维素培养基上生长迟缓^[23]的结果是类似的,因此推测 *lelcrp1* 基因沉默子菌丝生长速率降低是由于木质纤维素降解相关酶基因表达受到抑制造成的。

本研究通过 RNAi 技术初步研究了白腐真菌香菇转录因子基因 *lelcrp1* 的功能,发现此基因可影响香菇部分木质纤维素酶基因的表达水平,拓展了 HMG-box 型转录因子的功能,为进一步揭示香菇木质纤维素酶基因表达调控规律奠定了基础。

参考文献

- [1] Roysse DJ, Sanchez JE. Ground wheat straw as a substitute for portions of oak wood chips used in shiitake (*Lentinula edodes*) substrate formulae. *Bioresource Technology*, 2007, 98(11): 2137–2141.
- [2] Znameroski EA, Coradetti ST, Roche CM, Tsai JC, Iavarone AT, Cate JHD, Glass NL. Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellobextrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): 6012–6017.
- [3] Nakazawa T, Izuno A, Kodera R, Miyazaki Y, Sakamoto M, Isagi Y, Honda Y. Identification of two mutations that cause defects in the ligninolytic system through an efficient forward genetics in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Environmental Microbiology*, 2016, 19(1): 261–272.
- [4] Štros M, Launholt D, Grasser KD. The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64(19/20): 2590–2606.
- [5] Merz K, Hondele M, Goetze H, Gmelch K, Stoeckl U, Griesenbeck J. Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes & Development*, 2008, 22(9): 1190–1204.
- [6] Ray S, Grove A. The yeast high mobility group protein HMO₂, a subunit of the chromatin-remodeling complex INO80, binds DNA ends. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(19): 6389–6399.
- [7] MacAlpine DM, Perlman PS, Butow RA. The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(12): 6739–6743.
- [8] Stillman DJ. Nhp6: a small but powerful effector of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2010, 1799(1/2): 175–180.
- [9] Albert B, Colleran C, Léger-Silvestre I, Berger AB, Dez C, Normand C, Perez-Fernandez J, McStay B, Gadal O. Structure-function analysis of Hmo1 unveils an ancestral

- organization of HMG-Box factors involved in ribosomal DNA transcription from yeast to human. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(22): 10135–10149.
- [10] Dequard-Chablat M, Alland C. Two copies of *mtmg1*, encoding a novel mitochondrial HMG-like protein, delay accumulation of mitochondrial DNA deletions in *Podospora anserina*. *Eukaryot Cell*, 2002, 1(4): 503–513.
- [11] Ohm RA, de Jong JF, de Bekker C, Wösten HA, Lugones LG. Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation. *Molecular Microbiology*, 2011, 81(6): 1433–1445.
- [12] Shi LL, van Peer AF, Guo L, Chen RL, Wang W, Yan JJ, Deng YJ, Xie BG. *Agrobacterium*-mediated transformation of an endogenous HMG-box transcription factor *fvhom1* in *Flammulina velutipes*. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(6): 1268–1274. (in Chinese)
施乐乐, van Peer AF, 郭丽, 陈仁良, 王威, 严俊杰, 邓优锦, 谢宝贵. 农杆菌介导一个内源 HMG-box 转录因子 *fvhom1* 转化金针菇. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(6): 1268–1274.
- [13] Cai YL, Gong YH, Liu W, Hu Y, Chen LF, Yan LL, Zhou Y, Bian YB. Comparative secretomic analysis of lignocellulose degradation by *Lentinula edodes* grown on microcrystalline cellulose, lignosulfonate and glucose. *Journal of Proteomics*, 2017, 163: 92–101.
- [14] Cho JH, Lee SE, Chang WB, Cha JS. *Agrobacterium*-mediated transformation of the winter mushroom, *Flammulina velutipes*. *Mycobiology*, 2006, 34(2): 104–107.
- [15] Li C, Gong WB, Zhang L, Yang ZQ, Nong WY, Bian YB, Kwan HS, Cheung MK, Xiao Y. Association mapping reveals genetic loci associated with important agronomic traits in *Lentinula edodes*, shiitake mushroom. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 237.
- [16] Chen LF, Gong YH, Cai YL, Liu W, Zhou Y, Xiao Y, Xu ZY, Liu Y, Lei XY, Wang GZ, Guo MP, Ma XL, Bian YB. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160336.
- [17] Liu WZ, Xie YB, Ma JY, Luo XT, Nie P, Zuo ZX, Lahrmann U, Zhao Q, Zheng YY, Zhao Y, Xue Y, Ren J. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*, 2015, 31(20): 3359–3361.
- [18] Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(11): 973–981.
- [19] Dörnte B, Kües U. Fast microwave-based DNA extraction from vegetative mycelium and fruiting body tissues of agaricomycetes for PCR amplification. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*, 2013, 7(4): 825–836.
- [20] Liu XM, Wu XL, Chen Q, Qiu ZH, Zhang JX, Huang CY. Effects of heat stress on *Pleurotus eryngii* mycelial growth and its resistance to *Trichoderma asperellum*. *Mycosystema*, 2017, 36(11): 1566–1574. (in Chinese)
刘秀明, 邬向丽, 陈强, 仇志恒, 张金霞, 黄晨阳. 高温胁迫对刺芹侧耳菌丝生长及其抗棘孢木霉能力的影响. 菌物学报, 2017, 36(11): 1566–1574.
- [21] Fan XZ, Zhou Y, Xiao Y, Bian YB. Cloning and characterization of two allelic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Auricularia auricula-judae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(1): 181–189.
- [22] Todd RB, Zhou M, Ohm RA, Leeggangers HA, Visser L, de Vries RP. Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi. *BMC Genomics*, 2014, 15: 214.
- [23] Saloheimo A, Aro N, Ilmén M, Penttilä M. Isolation of the *acel* gene encoding a Cys₂-His₂ transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(8): 5817–5825.

Function analysis of HMG-box transcription factor *lelcrp1* in *Lentinula edodes*

Yue Hu, Yingli Cai, Jingjing Yu, Yan Zhou, Junping Li, Yinbing Bian, Yuhua Gong*

Institute of Applied Mycology, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] The objective of this study was to analyze the function of the HMG-box transcription factor LELCRP1 (*Lentinula edodes* lignocellulase genes regulation protein 1) in the expression of lignocellulase genes. [Methods] The RNAi vector of *lelcrp1* was constructed by double-joint and homologous recombination, then transformed into the mycelia of *Lentinula edodes* heterotypic strain W1 by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT). The copy number of the inserted fragment in the genome of strain W1 was detected by Southern blotting. Fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression level of lignocellulase genes in RNAi transformants, and the mycelial growth rate was measured on MYG plates. [Results] We got four RNAi transformants which were significantly down-regulated by 6 to 7-fold compared with the original strain W1. The results of Southern blotting showed that the *lelcrp1* gene fragment had been successfully integrated into the genome of *Lentinula edodes* in a single copy. Analysis of expression profiles of 26 lignocellulase genes in two RNAi transformants revealed that 9 cellulase genes, 1 hemicellulase gene, 2 auxiliary enzymes AA9 gene and 1 manganese peroxide gene were down-regulated significantly, compared to the original strain. The mycelial growth rate of RNAi transformants were significantly slower than the original strain. [Conclusion] The expression of *lelcrp1* was silenced successfully by RNAi, resulting in down-regulation of the expression level of some cellulose and ligninase genes. The HMG-box domain transcription factor could regulate the expression of lignocellulase genes.

Keywords: *Lentinula edodes*, HMG-box transcription factor, lignocellulase genes, expression regulation, RNAi

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201503137) and Key Technical Innovation Projects of Hubei Province (2016ABA100)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-87282221; E-mail: gongyuhua@mail.hzau.edu.cn

Received: 26 December 2017; Revised: 29 January 2018; Published online: 21 March 2018