



基于转录组测序的姬松茸镉胁迫下内参基因筛选

黄在兴^{1,2}, 陈华³, 翁伯琦⁴, 刘斌², 王义祥^{4*}, 刘朋虎^{1,4*}

¹福建农林大学国家菌草工程技术研究中心, 福建 福州 350002

²广西大学农学院, 广西大学食用菌研究所, 广西 南宁 530004

³福建省农业科学院科研处, 福建 福州 350003

⁴福建省红壤山地农业生态过程重点实验室, 福建 福州 350003

摘要: 【目的】筛选不同实验条件下, 尤其是镉胁迫下的姬松茸内参基因, 为研究姬松茸镉富集相关基因功能研究奠定基础。【方法】根据不同浓度Cd (0、2、5 mg/L)胁迫下菌丝中转录组表达量数据, 筛选出18个候选基因, 设计了30对引物; 根据引物扩增的特异性、扩增效率初步筛选出来自不同基因的5对引物; 运用qRT-PCR检测了5个基因在不同浓度Cd胁迫下的菌丝样品、原基、菌柄和菌盖中的 C_t 值, 利用geNorm、NormFinder和BestKeeper对这些基因的表达稳定性进行评价。【结果】SGT2和STK是菌丝阶段Cd胁迫下最稳定的2个候选内参基因, GAPDH是不同组织中最稳定的内参基因, SGT2、STK和GAPDH是所有实验条件下最稳定的3个内参基因。【结论】在姬松茸镉胁迫条件下, 本研究筛选出的SGT2和STK比常用的内参基因表现出更强的稳定性。

关键词: 巴西蘑菇, 镉胁迫, 不同组织, 荧光定量 PCR

姬松茸(*Agaricus brasiliensis*), 又名巴西蘑菇, 是一种原产于巴西的重要食药菌, 具有抗肿瘤作用、抗炎作用、调节免疫作用、抗突变作用, 还可用于治疗糖尿病、高脂血症等^[1], 但姬松茸镉(Cd)富集能力强, 对消费者的健康构成潜在威胁。Huang 等^[2]对姬松茸的 Cd 积累模式及

Cd 积累与磷之间的关系进行了研究; Wang 等^[3]则通过抑制消减杂交技术发现了 39 个与姬松茸 Cd 响应有关的基因, 已知 26 个基因参与代谢、细胞运输、运输促进、运输途径和转录等, 还有 13 个基因是编码未知功能的假定蛋白, 通过 qRT-PCR 验证了已知基因中的 6 个基因, 可见,

基金项目: 中央引导地方科技发展专项(2020L3030); 福建省科技厅农业引导性(重点)项目(2020N0007); 福建省红壤山地农业生态过程重点实验室开放课题(Aephrs-202001); 福建农林大学学科交叉融合项目(XKJC-71202103C)

*通信作者。王义祥, E-mail: sd-wolong@163.com; 刘朋虎, Tel/Fax: +86-591-83789223, E-mail: phliu1982@163.com

收稿日期: 2021-01-21; 修回日期: 2021-04-13; 网络出版日期: 2021-05-10

姬松茸对 Cd 的富集是多方面调控的, 其过程极其复杂, 以上证据还不足以揭示姬松茸富集 Cd 的机制。

基因的表达分析对于理解生物某些特定功能至关重要^[4-5], 更深入和更广泛地分析 Cd 胁迫下姬松茸相关基因表达量的变化, 有助于揭示姬松茸 Cd 富集分子机制。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR), 具有灵敏、准确、可重复性等优点, 被广泛应用于基因表达分析, qRT-PCR 通过实时检测扩增过程中达到规定荧光强度所需的周期数, 即循环阈值(C_t), 基因起始拷贝数越多 C_t 值越小^[6-9], 可通过 C_t 值比较样本之间的转录水平, 并可计算出样本中不同基因的表达水平^[10]。

选择合适的内参基因来标准化是保证 qRT-PCR 结果可靠性的关键^[3,11], 一些管家基因, 如 actin (ACT)、TUB、18S rRNA、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)等被用作内参基因^[3,12-14], 但许多研究表明, 这些管家基因在特殊的实验条件下, 特别是在 Cd 胁迫^[15-16]、高温胁迫^[17-18]、干旱胁迫^[19]和盐胁迫^[20]等实验条件下表达不稳定, 可见, 在特定的实验条件下找出表达稳定的内参基因对目标基因的表达量进行校准至关重要^[21]。但目前未见有关于姬松茸在 Cd 胁迫下内参基因研究的报道, 为了更准确分析姬松茸功能基因的表达, 有必要系统地筛选和评价适合姬松茸在 Cd 胁迫下的内参基因。

本课题组前期已经完成了两个姬松茸菌株在不同 Cd 浓度胁迫下的转录组数据分析^[22], 在此基础上本研究从转录组数据中初步筛选出在不同 Cd 浓度胁迫下 18 个表达量较高且变化不大的基因, 为了评价这 18 个基因在不同 Cd 浓度

胁迫下作为内参基因的可能, 设计了 30 对特异性引物(表 1), 通过 qRT-PCR 检测了候选内参基因在不同 Cd 浓度胁迫(0、2、5 mg/L)下和子实体不同发育阶段的表达, 并运用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 对以上候选内参基因进行了表达稳定性评价, 旨在为姬松茸在 Cd 胁迫下提供可靠的内参基因, 以便为更好理解姬松茸 Cd 富集相关功能基因和揭示相关分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验分组及培养条件

A 组——姬松茸的不同组织(原基、菌柄及菌盖): 采用熟料袋栽方式出菇。将配方中各种培养料混合均匀, 按 1:1.25 的比例计算加水量, 混合均匀的培养料分装到聚丙烯袋中, 每袋装料 0.8 kg, 放入高压灭菌锅中, 121 °C 灭菌 2 h, 接种后在 26 °C 恒温培养室中培养, 待菌丝走满袋后, 移到栽培室, 开袋覆土。依次收集原基、菌柄和菌盖备用。

培养料配方: 棉籽壳 20%, 玉米芯 12.5%, 牛粪 35%, 麸皮 10%, 稻草 20%, CaCO_3 1%, 石灰 1.5%。

B 组——不同 Cd 浓度胁迫下的姬松茸菌丝: 姬松茸菌株福姬 77 (J77)与福姬 1 (J1)分别在 Cd 浓度为 0、2、5 mg/L 的液体培养基中培养 20 d, 收集菌丝备用。

液体培养基组成: 土豆 230 g/L、蔗糖 20 g/L、磷酸二氢钾 2 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、 VB_1 10 mg/L。

C 组: A 组样品+B 组样品。

表 1. 引物信息
Table 1. Primer information

Primers number	The name of the genes	Gene annotation	Primer sequences (5'—3')	$T_m/^\circ\text{C}$	Length of product/bp
1	c32039.graph_c0	Endopolyphosphatase	60-S: GCACTGTATCTCGCCTCGGTAG 1-A: GAACCAGTGC GAAATACCTTGAC	61.6±0.5	245
2	c32039.graph_c0	Endopolyphosphatase	2-S: TGATTGCGGGCTTTACTTGC 2-A: CCGTCCGAAACCCAGATTG	61.95±0.65	302
3	c32039.graph_c0	Endopolyphosphatase	3-S: CCTCATAACATCATGGCTCCTG 3-A: GGGTCATCCCTATCTCCGTATTG	60.6±1.0	224
4	c32039.graph_c0	Endopolyphosphatase	4-S: TCCGACCCACAATCGTGTC 4-A: TGCATGGTCTCGGGGCTAGG	64.4±1.0	174
5	c32039.graph_c0	Endopolyphosphatase	5-S: TTCTTTTTTCGGACCACTACACC 5-A: GTCACTGAGGACCGTGCTCG	60.65±0.35	299
6	c28585.graph_c0	Small glutamine-rich tetra- tripeptide repeat-containing protein 2 (SGT2)	6-S: ATGTTTCTTCGCCTGTCGATC 6-A: TACGGCTCGTCGGAGTGTC	60.25±0.85	325
7	c28585.graph_c0	Small glutamine-rich tetra- tripeptide repeat-containing protein 2 (SGT2)	7-S: CCGTTCAAGTCCACCATTAGC 7-A: CCTAATAACAGCGGTCTCAAATCC	60.65±0.95	258
8	c28618.graph_c0	Serine/threonine-protein kinase (STK)	8-S: CAAGCCCTACTGCCTCTATCTCG 8-A: GGGGACCCATACCAAGTTCATC	62.25±0.25	335
9	c28618.graph_c0	Serine/threonine-protein kinase (STK)	9-S: AAAATCCAAACGAGCGACAATG 9-A: CCGTTCGTCGCAATCAAATAC	61.3±0.6	189
10	c28651.graph_c0	FAD linked oxidases, C-terminal domain; FAD binding domain	10-S: CGCACAACTCGGACTGGATG 10-A: GCCGCCAATCTGACAACTCC	62.3±0.3	347
11	c30371.graph_c0	hypothetical protein	11-S: TCTAATTCCTCACTACGGGTTTCG 11-A: TGCCTCGCTACATCTCCATC	61.45±0.95	288
12	c30543.graph_c0	Calcium permeable stress-gated cation channel	12-S: AGGTGAACGGGCTCTCGCAG 12-A: CGGACGAGGTTTATGAGGAACG	64.2±0.7	268
13	c30806.graph_c0	DNA replication ATP-dependent helicase	13-S: GGTGAGAGAAAGACTCCGTGG 13-A: GAATCAACAACCTCCGCAATC	59.05±0.45	203
14	c30901.graph_c1	Heavy metal tolerance protein	14-S: CCTCTGCTCTTCCCTTGC 14-A: AGGACAAGGGGACAAGAGTC	59.25±0.25	232
15	c30933.graph_c0	Vacuolar protein sorting-associated protein	15-S: GACGAGGCTCAAAGTGGACAAG 15-A: CATTATCTCTAAGGGGGCATC	60.85±0.55	196
16	c31128.graph_c0	Rho guanine nucleotide exchange factor scd1	16-S: GGCGGTAATGAATTGGAAGGTC 16-A: GGACAGTCTTCTCAACGGTTCTTC	61.9±0.6	192
17	c31395.graph_c0	Cyclin	17-S: TCAAAAACCTCCTCCGGTCTAAAG 17-A: TCGCCACTCAAGTCGTCTGC	60.85±0.95	193
18	c31397.graph_c0	Nuclease 1, mitochondrial (Precursor) (pnu1)	18-S: AGTGGGCACAGAAACATTTGG 18-A: GCAGGAAGCGATGGATGAGAC	60.9±1.0	235
19	c31695.graph_c0	DNA polymerase family B	19-S: GCCAGGTCACAAAGCATACG 19-A: TGTCACCAACGAGACTATGCTTC	59.2±0.3	243

(待续)

(续表 1)

20	c32021.graph_c0	Rho-type GTPase-activating protein 1	20-S: GGCGTTGAGGCGGTTGTATC 20-A: GAGCTGTCGCCGATGATTTAC	61.3±1.4	167
21	c4736.graph_c0	18S rRNA	S: AAGCAGTATTCAGTATGGCAACC; A: AATGGCTTGTTCCTTTGGGAG	58.5±0.2	211
22	c4736.graph_c0	18S rRNA	S: TCTCTCCCAAAGAAACAAGCC A: AAGGTTTAGCAAATTGGTTGTCC	59.2±0.5	293
23	c14447.graph_c0	α -tubulin	S: GAAAGTGAGACCAGTCTGTTGTTG A: TCTTTGTGTGTTTCAGTGTTTCGTTG	59.35±1.05	253
24	c31752.graph_c1	GAPDH	S: ATTGCCACAAAATGGGAAAGAC A: GTTGTGTATTTGTTGGTGCTCG	59.55±1.25	209
25	c31752.graph_c1	GAPDH	S: AGAAACGACCTGATCCTCTGTG A: AGCAGCCCAGAACATCATCC	59±0.7	250
26	c31752.graph_c1	GAPDH	S: AGAAACGACCTGATCCTCTGTG A: AGCAGCCCAGAACATCATCC	59.25±0.45	216
27	c31752.graph_c1	GAPDH	S: TAACGGTTTCGGTCGTATCG A: CGTTCGGCAAAGACTTTCATAG	59.8±1.1	269
28	c31752.graph_c1	GAPDH	S: TTCGGCTCATTTGAAGGGTG A: CACGCCAGTCCTTGTGAGAG	61.3±0	244
29	c55882.graph_c0	α -actinin	S: ATCCCCTTAGCCTGGTCTTG A: TCCCAGGAGTGGATAGGTAAG	58.45±0.65	167
30	c25638.graph_c0	Actin-related protein	S: TTTGAACATCTGCTCTGTGTGG A: TGAAAGACACAACAAACCAGAAG	57.95±0.65	295

1.2 总 RNA 和 cDNA 第一链合成

使用植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)对各样品的总 RNA 进行提取, 使用 OMEGA 公司 DNase I (RNaseFree) 处理消除基因组 DNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶在 6 V/cm 条件下电泳检测 RNA 完整性和质量。使用 cDNA 合成试剂盒 EasyScript[®] First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (北京全式金生物技术有限公司) 合成各样品 cDNA 的第一链。

1.3 引物设计及初步筛选

根据本实验课题组前期转录组数据, 采用 Primer Premier 5.0 设计引物(表 1), 以姬松茸菌丝 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 扩增总体系为 20 μ L: 2 \times Taq PCR Mix (北京全式金生物技术

有限公司) 10 μ L, Forward Primer 0.5 μ L, Reverse Primer 0.5 μ L, ddH₂O 8 μ L, DNA 1 μ L; 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶在 5 V/cm 条件下电泳 40 min, 在凝胶成像系统中观察 PCR 产物条带。

1.4 实时荧光定量 PCR

以 5 倍稀释 cDNA 样品, 共稀释 6 个梯度, 使用含有 1、1/5、1/25、1/125、1/625、1/3125 倍的 cDNA 样品作为反应模板, 在 Bio-Rad CFX96TM Real-Time System 上进行荧光定量 PCR, 仪器自动获得内参基因的扩增效率 E、相关系数 R^2 及熔解温度等系列参数。

qRT-PCR 反应体系为 25 μL , 包括: 2 \times SYBR Green qRT-PCR Master Mix 12.5 μL , Forward Primer 0.5 μL , Reverse Primer 0.5 μL , ddH₂O 10.5 μL , 各样品 cDNA 1 μL ; 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 40 个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 97 $^{\circ}\text{C}$ 10 s。形成溶解曲线, 每个基因设 3 个重复, 反应后根据溶解曲线确保 PCR 产物具有特异性, 导出内参基因的 C_t 值。

1.5 数据分析

用 Excel 计算候选内参基因的 C_p 值(所有样品 C_t 值的平均值)及其标准差(SD), 采用 GraphPad Prism 5.0 对候选内参基因的 C_p 值进行作图, 以显示候选内参基因的稳定性的稳定性, 运用 geNorm 软件通过在内参基因的矩阵内进行成对比较确定候选内参基因的稳定值(M 值)^[23]; 利用 NormFinder 软件将内参基因的组合和组间方差相结合来确定稳定值^[24]; 通过 BestKeeper 来计算各内参基因的 C_t 值的标准差(SD)和变异系数(CV)^[25], 以上 3 种方法对应的结果值越小就表明内参基因的稳定性的稳定性越好。

2 结果和分析

2.1 候选内参基因引物扩增效果和扩增特异性

表 1 对应的各编号引物的普通 PCR 扩增结果如图 1 所示, 结合 qRT-PCR 扩增结果分析, 最终 6 号(SGT2)、8 号(STK)、12 号(Calcium permeable stress-gated cation channel)、18 号(pnu1)和 27 号(GAPDH)的引物普通 PCR 扩增产物条带单一、清晰, 与预期大小一致, qRT-PCR 扩增产物的溶

解峰单一。除以上 5 对引物外, 其他引物的普通 PCR 扩增条带不单一或不清晰, qRT-PCR 扩增产物的溶解峰不单一。常用的内参基因 18S rRNA、 α -tubulin 和 α -actinin 在本实验中表现出引物特异性不强, 以上内参基因在姬松茸 qRT-PCR 研究中也很少见, 多以 GAPDH 基因作为内参基因^[3,26]。因此以 27 号引物片段作为 GAPDH 基因进行后续的具体研究和评价。

6 号、8 号、12 号、18 号、27 号引物的扩增效率(E)和相关性(R^2)分别为 99.9%和 0.999、90.6%和 1.000、100.9%和 0.988、107.7%和 0.998、101.3%和 0.993, 以上结果说明 5 对候选引物符合 qRT-PCR 实验要求。

2.2 候选内参基因表达丰度分析

如图 2 所示, 5 个候选内参基因的 C_p 值在 18.65–23.36 之间, 具有较高的表达量, GAPDH (18.65 \pm 0.96)、SGT2 (21.16 \pm 0.97)、STK (22.36 \pm 0.922)、Calcium permeable stress-gated cation channel (22.94 \pm 1.76)和 pnu1 (23.36 \pm 1.36)的表达量依次降低, 其中 GAPDH 中值线在框中间且标准差较小, 因此 GAPDH 可能是较好的内参基因, 但在不同的实验条件下, 以上 5 个候选内参基因的稳定性的稳定性可能会发生变化, 因此为了在特定的实验条件下得到最优的内参基因, 我们需要结合具体实验条件来评价候选内参基因的稳定性的稳定性。

2.3 geNorm 评价候选内参基因的稳定性的稳定性及最佳内参基因数量的确定

geNorm 是 Vandesompele 等^[23]编写的内参基因筛选程序, 可确定 2 个或 2 个以上的内参基因组合来校正 qRT-PCR 数据。在数据输入

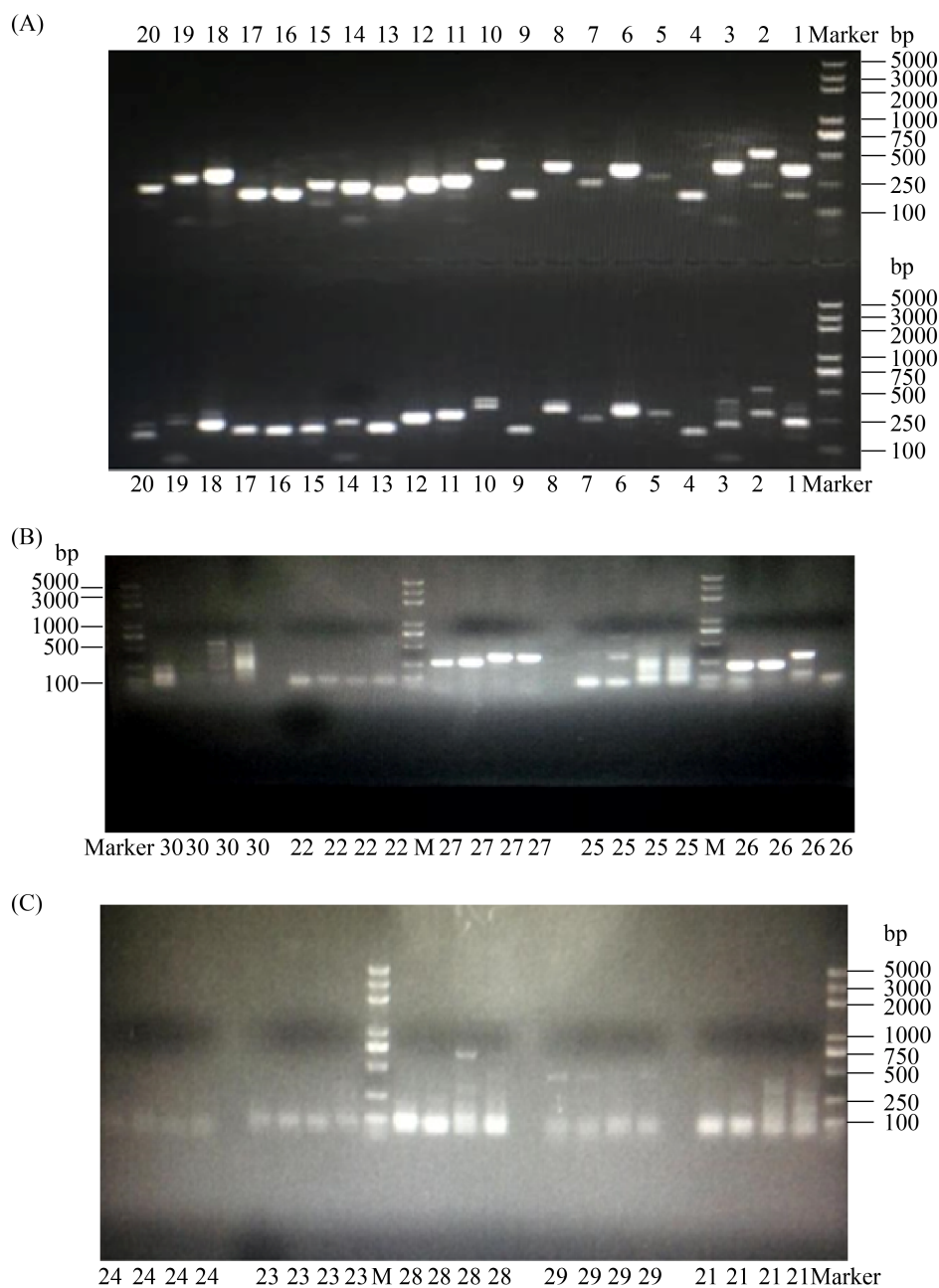


图 1. 各引物普通 PCR 扩增产物条带

Figure 1. PCR product bands of primers. The numbers in the figure correspond to the numbers in Table 1. Lane 1–20: No. 1–20; B: No. 25–27, 22, No. 30; C: No. 21, No. 23–24, No. 28–29.

geNorm 之前, 需要先算出候选内参基因的 $2^{-\Delta C_t}$, $\Delta C_t =$ 候选内参基因在样品中的 C_t 值 - 该基因在样品中最小的 C_t 值 (表达量最高)。如图 3 (A1、B1、C1) 所示, 通过 geNorm 软件分析, 在 3 组实验中,

稳定性最好的 2 个内参基因均为 GAPDH 和 SGT2, 且 STK、Calcium permeable stress-gated cation channel、pnu1 稳定性依次降低。通过 geNorm 软件进一步分析最适数据归一化内参基

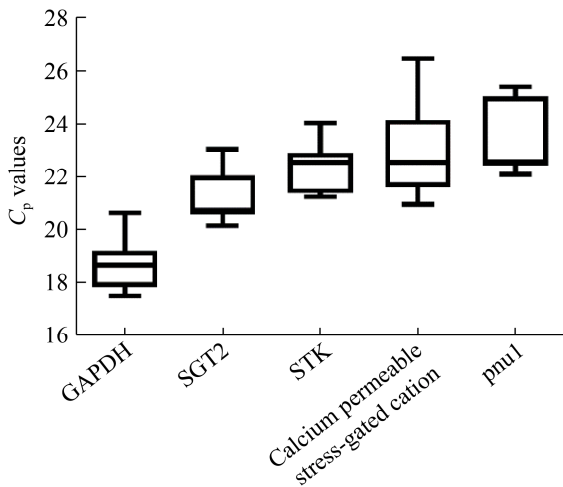


图 2. 候选内参基因表达量比较

Figure 2. Comparison of expression levels of candidate reference genes. The middle line represents the median value, the box represents the 10th/90th percentile, and the error line represents the maximum and minimum C_p values.

因数目发现(图 3-A2、B2、C2), A 组和 B 组的 $V2/3$ 值分别为 0.035 和 0.081, 均小于 0.15, 因此, 在 A 组和 B 组试验条件下的最适内参基因数目均为 2, C 组的 $V2/3=0.166>0.15$, 所以在 C 组实验条件下最适内参基因数目为 $n+1=3$ 。

2.4 NormFinder 评价候选内参基因的稳定性

NormFinder 是由 Andersen 等^[24]编写的内参基因稳定性评价程序, 数据预处理与 geNorm 一样, 先计算出各候选内参基因的 $2^{-\Delta C_t}$, 但该程序只能筛选出一个最合适的内参基因。经 NormFinder 对候选内参基因的稳定性分析发现(表 2), 在 3 组实验条件下 STK 的值最小, 即最优的内参基因为 STK, 在 B 组和 C 组实验条件下候选内参基因稳定性排序依次为 STK、SGT2、GAPDH、pnu1 和 Calcium permeable stress-gated cation channel, 在 A 组实验条件下候选内参基因

稳定性排序依次为 STK、GAPDH、SGT2、pnu1 和 Calcium permeable stress-gated cation channel。

2.5 BestKeeper 评价候选内参基因的稳定性

BestKeeper 通过在特定实验条件下 C_p 值的标准差(SD)和变异系数(CV)来评价候选内参基因的稳定性, SD 和 CV 越小内参基因的稳定性越好。如表 3 所示, 5 个候选内参基因在 A 组实验条件下 GAPDH 的稳定性最高, 其次是 Calcium permeable stress-gated cation channel、STK、SGT2 和 pnu1; 在 B 组实验条件下 SGT2 表达稳定性最好, 其次是 STK、GAPDH、pnu1 和 Calcium permeable stress-gated cation channel; 而在 C 组实验条件下候选内参基因 STK 表达稳定性最高, 其次是 GAPDH、SGT2、pnu1 和 Calcium permeable stress-gated cation channel, 可见在不同实验条件下基因表达稳定性会发生较大的变化。

通过 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 对候选内参基因的稳定性进行了分析, 虽然每个软件得出的结果稍有不同, 但通过以上结果不难看出, 在 B 组和 C 组实验条件下 Calcium permeable stress-gated cation channel 和 pnu1 的候选内参基因稳定性差, 不推荐作为 B 组和 C 组实验条件下的内参基因; 在 A 组实验条件下, GAPDH 是最佳的内参基因, pnu1 是最不稳定的基因; 结合 NormFinder 和 BestKeeper 分析结果以及 geNorm 对最佳内参基因数目的确定, 在 B 组实验条件下, SGT2 和 STK 是 2 个最佳的内参基因; 在 C 组实验条件下, $V2/3=0.166>1.5$, 因此需要 3 个内参基因, 则 SGT2、STK 和 GAPDH 是最佳的内参基因组合。

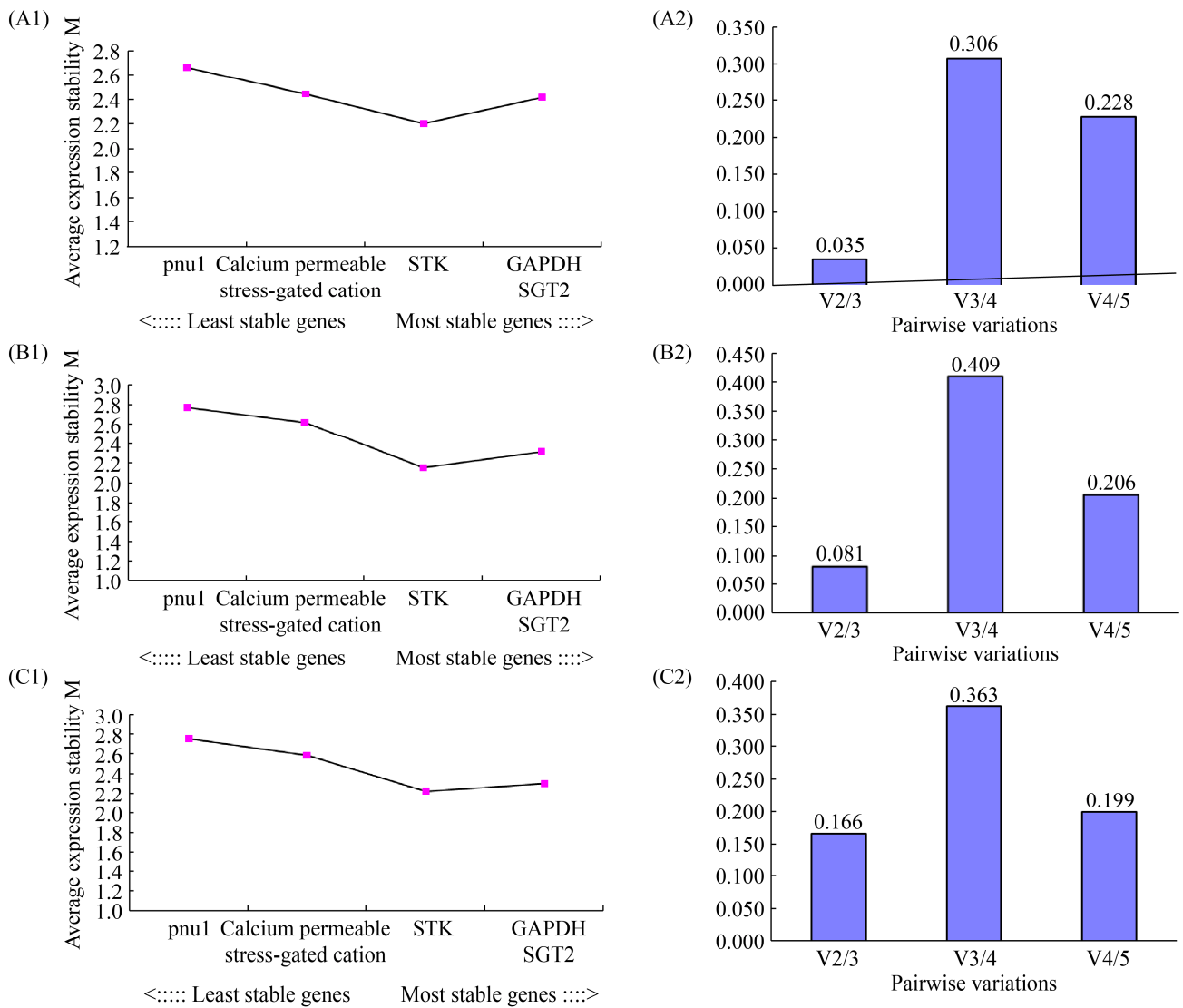


图 3. 候选内参基因 geNorm 分析

Figure 3. Analysis of candidate reference genes by geNorm. A1, B1, C1 represent the expression stability of candidate reference genes in groups A, B and C, respectively. A2, B2, C2 represent the determination of the number of reference genes normalized to the most suitable data in groups A, B and C, respectively.

表 2. 候选内参基因 NormFinder 分析

Table 2. NormFinder analysis of the candidate reference genes

Candidate reference genes	Group A	Group B	Group C
SGT2	0.507	0.359	0.371
STK	0.205	0.193	0.239
Ca-permeable stress-gated cation channel	0.963	1.183	1.056
pnu1	0.740	0.635	0.620
GAPDH	0.334	0.449	0.416

3 讨论

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)被认为是用于基因表达分析的最新技术之一^[27], 选择合适的内参基因越来越受到关注^[20], 也是影响 qRT-PCR 结果可靠性的主要因素之一^[18], 任何一个基因不可能作为所有实验条件下的内参基因^[28-29]。因

表 3. 候选内参基因 BestKeeper 分析
Table 3. BestKeeper analysis of the candidate reference genes

Candidate reference genes	Group A		Group B		Group C	
	SD	CV	SD	CV	SD	CV
SGT2	1.11	5.2	0.63	3.01	0.79	3.75
STK	0.66	2.85	0.73	3.31	0.71	3.17
Calcium permeable stress-gated cation channel	0.4	1.73	1.76	7.76	1.31	5.69
pnu1	1.3	5.57	1.12	4.82	1.18	5.07
GAPDH	0.26	1.4	0.97	5.21	0.73	3.89

此, 很有必要系统地筛选和评价生物在不同生长时期和生物或非生物胁迫下的内参基因^[30-31]。

GAPDH 经常被用作食药菌基因表达分析的内参基因, 如分析灵芝中三萜合成基因的表达^[14]、姬松茸中 Cd 响应的相关基因^[3]及转录组数据验证^[26]等。然而, Xu 等^[32]的研究表明 GAPDH 因序列高相似性和引物低特异性在灵芝中不适合作为内参基因。Zhao 等^[17]系统评价了在高温胁迫下香菇中 10 种传统内参基因(TUB, TUA, GAPDH, EF1, 18S, GTP, ACT, UBI, UBC 和 H2A)的稳定性, 发现 GAPDH 的标准偏差(SD)值大于 1, 不适合作为该实验条件下的内参基因; 此外, GAPDH 也不适合作为冷杉(松杉)干旱胁迫下的内参基因^[19]。Xiang 等^[33]的研究分析表明 18S 是香菇不同发育阶段的最佳内参基因, 18S 也属于常用的内参基因之一, 但该研究未评论 GAPDH 的稳定性。本研究运用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 对姬松茸中常用的内参基因(GAPDH)以及其他 4 个候选内参基因(SGT2、STK、Calcium permeable stress-gated cation channel、pnu1)表达的稳定性进行分析, 以上 3 种软件可以足够预测候选内参基因的稳定性

性^[34], 结果表明姬松茸菌丝在 Cd 胁迫下 GAPDH 的 SD 值接近 1 (0.97), 其稳定性不如 SGT2 和 STK, 但它是不同组织中表达最稳定的基因。

经常被用作内参基因的管家基因表达量在 Cd 胁迫下会发生明显变化^[16], Gao 等^[15]的研究表明, 在 Cd 胁迫下大豆的根和叶中 60S 和 UKN2 是表达最稳定的基因, 而 Gu 等^[35]发现马蔺(*Iris lacteal* var. *chinensis*)中 UBC 和 EF1b 是 Cd 胁迫下表达最稳定的基因。可见, 在 Cd 胁迫下不同生物体内表达稳定的基因也不同。在本研究中, 3 种软件的评价结果虽然稍有不同, 在 Tian 等^[36]的研究中也存在同样现象, 但综合 3 个软件的分析结果不难发现姬松茸菌丝在不同浓度 Cd 胁迫下, GAPDH 的表达不如 SGT2 和 STK 稳定; 在所有实验条件下(不同浓度 Cd 胁迫和不同组织中) GAPDH、SGT2 和 STK 是最佳的内参基因组合。因此, 在使用 qRT-PCR 对姬松茸进行基因表达分析时, 需要根据不同的实验条件选择合适的内参基因, 这与上述文献结果相似。

SGT2 是一种伴侣蛋白, 其 TPR 结构域高度保守^[37]; STK 在细胞生长过程中有着关键作用^[38], Azad 等^[39]将其归为稳定类蛋白; GAPDH 是参与

糖酵解的一种关键酶, 具有保守序列^[40], 这说明 SGT2、STK 和 GAPDH 在一定程度上是稳定表达的, 并且在本研究中它们都具有很好的扩增效率和相关性。此外, 一个好的内参基因需要具备合适的表达水平, 通常情况下内参基因的 C_p 值在 15–30 具有准确的标准化功能^[41], 本研究分析中 5 个候选内参基因的 C_p 值为 18.65–23.36, 其中 GAPDH、SGT2 和 STK 分别为 18.65、21.16 和 22.36, 这表明 GAPDH、SGT2 和 STK 符合优良内参基因的要求。

本研究首次报道 SGT2 和 STK 可作为姬松茸在 Cd 胁迫下的候选内参基因, 研究结果可为更好地理解姬松茸相关分子生物学机制奠定基础, 也为其他食药菌的内参基因选择提供参考。

参 考 文 献

- [1] Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2008, 5(1): 3–15.
- [2] Huang JC, Li KB, Yu YR, Wu HW, Liu DL. Cadmium accumulation in *Agaricus blazei* Murrill. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, 88(8): 1369–1375.
- [3] Wang LL, Li HB, Wei HL, Wu XQ, Ke LQ. Identification of cadmium-induced *Agaricus blazei* genes through suppression subtractive hybridization. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 63: 84–90.
- [4] Boavida LC, Borges F, Becker JD, Feijó JA. Whole genome analysis of gene expression reveals coordinated activation of signaling and metabolic pathways during pollen-pistil interactions in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2011, 155(4): 2066–2080.
- [5] Xu YY, Zhu XW, Gong YQ, Xu L, Wang Y, Liu LW. Evaluation of reference genes for gene expression studies in radish (*Raphanus sativus* L.) using quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 424(3): 398–403.
- [6] Xu J, Xu ZC, Zhu YJ, Luo HM, Qian J, Ji AJ, Hu YL, Sun W, Wang B, Song JY, Sun C, Chen SL. Identification and evaluation of reference genes for qRT-PCR normalization in *Ganoderma lucidum*. *Current Microbiology*, 2014, 68(1): 120–126.
- [7] Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(2): 487–493.
- [8] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 1993, 11(9): 1026–1030.
- [9] Xiao Z, Sun XB, Liu XQ, Li C, He LS, Chen SP, Su JL. Selection of reliable reference genes for gene expression studies on *Rhododendron molle* G. don. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1547.
- [10] Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 85.
- [11] Liu X, Guan HR, Song M, Fu YP, Han XM, Lei M, Ren JY, Guo B, He W, Wei YH. Reference gene selection for qRT-PCR assays in *Stellera chamaejasme* subjected to abiotic stresses and hormone treatments based on transcriptome datasets. *PeerJ*, 2018, 6: e4535.
- [12] Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(21): 1869–1872.
- [13] Liang CX, Li YB, Xu JW, Wang JL, Miao XL, Tang YJ, Gu TY, Zhong JJ. Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1367–1374.
- [14] Shang CH, Shi L, Ren A, Qin L, Zhao MW. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a

- lanosterol synthase gene from *Ganoderma lucidum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2010, 74(5): 974–978.
- [15] Gao MM, Liu YP, Ma X, Shuai Q, Gai JY, Li Y. Evaluation of reference genes for normalization of gene expression using quantitative RT-PCR under aluminum, cadmium, and heat stresses in soybean. *PLoS ONE*, 2017, 12(1): e0168965.
- [16] Basa B, Solti Á, Sárvári É, Tamás L. Housekeeping gene selection in poplar plants under Cd-stress: comparative study for real-time PCR normalization. *Functional Plant Biology: FPB*, 2010, 36(12): 1079–1087.
- [17] Zhao X, Yang HL, Chen MJ, Song XX, Yu CX, Zhao Y, Wu YJ. Reference gene selection for quantitative real-time PCR of mycelia from *Lentinula edodes* under high-temperature stress. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 1670328.
- [18] Xu H, Bao JD, Dai JS, Li YQ, Zhu Y. Genome-wide identification of new reference genes for qRT-PCR normalization under high temperature stress in rice endosperm. *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e0142015.
- [19] Behringer D, Zimmermann H, Ziegenhagen B, Liepelt S. Differential gene expression reveals candidate genes for drought stress response in *Abies alba* (Pinaceae). *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0124564.
- [20] Xiao XL, Wu XM, Ma JB, Li PB, Li TT, Yao YN. Systematic assessment of reference genes for RT-qPCR across plant species under salt stress and drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, 37(9): 1–9.
- [21] Zhang Y, Zhang XD, Liu X, Li YS, Ding JP, Zhang XR, Zhang YH. Reference gene screening for analyzing gene expression across goat tissue. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2013, 26(12): 1665–1671.
- [22] Liu PH, Huang ZX, Luo XH, Chen H, Weng BQ, Wang YX, Chen LS. Comparative transcriptome analysis reveals candidate genes related to cadmium accumulation and tolerance in two almond mushroom (*Agaricus brasiliensis*) strains with contrasting cadmium tolerance. *PLoS ONE*, 2020, 15(9): e0239617.
- [23] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 2002, 3(7): RESEARCH0034.
- [24] Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 2004, 64(15): 5245–5250.
- [25] Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(6): 509–515.
- [26] Lu YP, Liao JH, Guo ZJ, Cai ZX, Chen MY. Genome survey and transcriptome analysis on mycelia and primordia of *Agaricus blazei*. *BioMed Research International*, 2020: 1824183.
- [27] Silveira TLR, Domingues WB, Remião MH, Santos L, Barreto B, Lessa IM, Varela Junior AS, Martins Pires D, Corcini C, Collares T, Seixas FK, Robaldo RB, Campos VF. Evaluation of reference genes to analyze gene expression in silverside *Odontesthes humensis* under different environmental conditions. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 75.
- [28] Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, Van Wuytswinkel O. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6(6): 609–618.
- [29] Tao YX, van Peer AF, Huang QH, Shao YP, Zhang L, Xie B, Jiang YJ, Zhu J, Xie BG. Identification of novel and robust internal control genes from *Volvariella volvacea* that are suitable for RT-qPCR in filamentous fungi. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29236.
- [30] Wu ZJ, Tian C, Jiang Q, Li XH, Zhuang J. Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalization during leaf development and hormonal stimuli in tea plant (*Camellia sinensis*). *Scientific Reports*, 2016, 6: 19748.
- [31] Bansal R, Mittapelly P, Cassone BJ, Mamidala P, Redinbaugh MG, Michel A. Recommended reference genes

- for quantitative PCR analysis in soybean have variable stabilities during diverse biotic stresses. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0134890.
- [32] Xu ZC, Xu J, Ji AJ, Zhu YJ, Zhang X, Hu YL, Song JY, Chen SL. Genome-wide selection of superior reference genes for expression studies in *Ganoderma lucidum*. *Gene*, 2015, 574(2): 352–358.
- [33] Xiang QJ, Li J, Qin P, He ML, Yu XM, Zhao K, Zhang XP, Ma MG, Chen Q, Chen XQ, Zeng XF, Gu YF. Identification and evaluation of reference genes for qRT-PCR studies in *Lentinula edodes*. *PLoS ONE*, 2018, 13(1): e0190226.
- [34] Qian J, Gao YN, Wang Y, Wu YY, Wang Y, Zhao YC, Chen HY, Bao DP, Xu JY, Bian XH. Selection and evaluation of appropriate reference genes for RT-qPCR normalization of *Volvariella volvacea* gene expression under different conditions. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 6125706.
- [35] Gu CS, Liu LQ, Xu C, Zhao YH, Zhu XD, Huang SZ. Reference gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in *Iris. lacteal* var. *chinensis* roots under cadmium, lead, and salt stress conditions. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 1–7.
- [36] Tian C, Jiang Q, Wang F, Wang GL, Xu ZS, Xiong AS. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves. *PLoS ONE*, 2015, 10(2): e0117569.
- [37] Kryzstofinska EM, Evans NJ, Thapaliya A, Murray JW, Morgan RML, Martinez-Lumbreras S, Isaacson RL. Structure and interactions of the TPR domain of Sgt2 with yeast chaperones and Ybr137wp. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2017, 4: 68.
- [38] Wu FL, Liu Y, Jiang HW, Luan YZ, Zhang HN, He X, Xu ZW, Hou JL, Ji LY, Xie Z, Czajkowsky DM, Yan W, Deng JY, Bi LJ, Zhang XN, Tao SC. The Ser/Thr protein kinase protein-protein interaction map of *M. tuberculosis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017, 16(8): 1491–1506.
- [39] Azad I, Alemzadeh A. Bioinformatic and empirical analysis of a gene encoding serine/threonine protein kinase regulated in response to chemical and biological fertilizers in two maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Molecular Biology Research Communications*. 2017, 6(2): 65–75.
- [40] Bao WL, Qu YL, Shan XY, Wan YL. Screening and validation of housekeeping genes of the root and cotyledon of *Cunninghamia lanceolata* under abiotic stresses by using quantitative real-time PCR. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(8): 1198.
- [41] Wan HJ, Zhao ZG, Qian CT, Sui YH, Malik AA, Chen JF. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Analytical Biochemistry*, 2010, 399(2): 257–261.

Screening of reference genes under cadmium stress in *Agaricus brasiliensis* based on transcriptome sequencing

Zaixing Huang^{1,2}, Hua Chen³, Boqi Weng⁴, Bin Liu², Yixiang Wang^{4*}, Penghu Liu^{1,4*}

¹ China National Engineering Research Center of JUNCAO Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

² College of Agriculture, Guangxi University, Institute of Mushroom, Nanning 530004, Guangxi Province, China

³ Scientific Research Office of Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

⁴ Fujian Province Key Laboratory of Agro-Ecological Processes in Hilly Red Soil, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

Abstract: **[Objective]** The aim of this study was to screen the reference genes of *Agaricus brasiliensis* under different experimental conditions, especially under cadmium (Cd) stress, and to lay the foundation for studying the functional studies of cadmium enrichment-related genes in *A. brasiliensis*. **[Methods]** We screened 18 candidate genes and designed 30 primer pairs based on the transcriptomes of mycelia under the stress of different concentrations of Cd (0, 2, 5 mg/L). According to the specificity and amplification efficiency of primers, 5 pairs of primers from different genes were selected. The Ct values of mycelia, primordium, stipe, and pileus of 5 genes under different concentrations of cadmium stress were detected by QRT-PCR, and the expression stability of these genes was evaluated by geNorm, NormFinder, and BestKeeper. **[Results]** The results showed that Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein 2 (SGT2) and Serine/threonine-protein kinase (STK) were the two most stable candidate reference genes under Cd stress in the mycelial stage, GAPDH was the most stable reference gene in different tissues and SGT2, STK and GAPDH were the three most stable reference genes under all experimental conditions. **[Conclusion]** Under Cd stress conditions in *A. brasiliensis*, SGT2 and STK screened in this study were more stable compared to the commonly used reference genes.

Keywords: *Agaricus brasiliensis*, cadmium stress, different tissues, qRT-PCR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Special Program for Central Government to Guide Local Science and Technology Development (2020L3030), by the Agricultural Guidance (Key) Project of Fujian Science and Technology Department (2020N0007), by the Fujian Province Key Laboratory of Agro-Ecological Processes in Hilly Red Soil Open Project (Aephrs-202001) and by the Fujian Agriculture and Forestry University Interdisciplinary Integration (XKJC-71202103C)

*Corresponding authors. Yixiang Wang, E-mail: sd-wolong@163.com; Penghu Liu, Tel/Fax: +86-591-83789223, E-mail: phliu1982@163.com

Received: 21 January 2021; Revised: 13 April 2021; Published online: 10 May 2021