

陈焕, 范天宁, 白玉东, 等. 金针菇中免疫调节蛋白编码基因 *FIP-fve* 的功能[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(2): 131-138.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.02.017

金针菇中免疫调节蛋白编码基因 *FIP-fve* 的功能

陈焕¹, 范天宁¹, 白玉东¹, 郭芡芡¹, 王浩安¹, 陈罡², 高英旭², 林景卫¹

1. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110866; 2. 辽宁省林业科学研究院, 沈阳 110032

摘要 为探究 *FIP-fve* 基因在金针菇本体的生物学功能, 构建了 pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve* 超表达载体并将其转化至农杆菌 LBA4404 中, 采用农杆菌介导的金针菇转化法, 最终获得了 *FIP-fve* 基因超表达的金针菇; 进行 *FIP-fve* 基因沉默 (RNAi: *FIP-fve*)、*FIP-fve* 超表达 (pGPD: *FIP-fve*) 和野生金针菇 (CK) 菌丝体培养和子实体栽培, 并记录菌丝体和子实体时期的生物学性状。结果显示: pGPD: *FIP-fve* 金针菇菌丝生长速度最快, CK 金针菇次之, 而 RNAi: *FIP-fve* 金针菇生长速度最为缓慢; 子实体出菇栽培后, 在子实体数量、菌柄长度、子实体产量和生物学效率方面, pGPD: *FIP-fve* 金针菇都明显优于 CK 金针菇, 而 RNAi: *FIP-fve* 金针菇的子实体生长状况最差。研究结果表明, *FIP-fve* 基因能够促进金针菇菌丝体的生长, 并对金针菇原基形成具有促进作用, 最终影响金针菇的产量。

关键词 金针菇; 真菌免疫调节蛋白; 基因沉默; 超表达载体; 遗传转化

中图分类号 S567.3⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)02-0131-08

金针菇 (*Flammulina filiformis*) 是伞菌纲 (Agaricomycetes)、伞菌目 (Agaricales)、白蘑科 (Tricholomataceae)、金针菇属 (*Flammulina*) 真菌, 富含各种必需氨基酸、维生素、矿物质、纤维、不饱和脂肪酸和蛋白质等多种营养成分^[1]; 具有抗氧化、免疫调节、降低胆固醇的功能^[2], 在促进人类健康方面是非常有效的食物^[3]。虽然金针菇拥有多种对人有益的化学成分和生物学功能, 但在利用遗传转化手段探究金针菇基因功能机制研究方面起步较晚。目前, 食用菌的转化方法主要包括原生质体介导的转化、农杆菌介导转化法和限制酶介导的整合法^[4], 其中农杆菌介导的转化法已被证明比其他的转化方法更稳定和有效^[5]。

真菌免疫调节蛋白 (fungal immunomodulatory protein, FIP) 是从食用和药用蘑菇中发现的一类结构与免疫球蛋白重链可变区相似的小分子蛋白, 例如灵芝中的 FIP-lz8、小孢子灵芝中的 FIP-gmi、草菇中的 FIP-vvo 等。随着生物技术的发展, 可通过同源克隆、基因组挖掘、蛋白质纯化和定向进化的手段从不同食用菌中发现 FIP。由于结构和序列上相似, FIP 构成了一个独特的蛋白质家族^[6]。现代药理学

实验证明 FIP 具有多种抗肿瘤活性, 包括抑制肿瘤细胞增长、诱导肿瘤细胞凋亡和自噬、降低肿瘤细胞的迁移和入侵; 也具有凝集血细胞、促进多种细胞因子的分泌、抗过敏、抗氧化^[7]、免疫调节、抗炎和神经突起生长活性等多种生物学作用^[8]。FIP-fve 是从金针菇中分离纯化得到的一种真菌免疫调节蛋白, 能够凝集人类红细胞, 增强 IL-2 和 IFN- γ 的转录表达^[9]。近年来, 发现 *FIP-fve* 也可以作为一种新兴的临床辅助物质用于抗过敏、抗炎症、抗气道重塑^[10]。然而目前关于 FIP-fve 的研究主要集中在重组表达后的体外生物学活性检测, 且大都集中于对动物和人的生物活性探究, 对于 FIP-fve 的认知仅在于蛋白所具有的生物免疫活性的研究水平, 而 *FIP-fve* 对于金针菇生物学功能的影响尚未见报道。为进一步探究 *FIP-fve* 在金针菇中的生物学功能, 本研究通过对 *FIP-fve* 基因超表达金针菇、*FIP-fve* 基因沉默金针菇和野生金针菇的生长发育情况进行比较分析, 探究 *FIP-fve* 基因在金针菇本体的生物学功能, 旨在为食用菌分子遗传育种和新品种选育提供基础。

收稿日期: 2022-08-03

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究基础项目 (LSNQN202013)

陈焕, E-mail: 2507297357@qq.com

通信作者: 林景卫, E-mail: 2009500003@syau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

FIP-fve 基因沉默的金针菇菌丝体、pCAMBIA1301 载体为笔者所在实验室保存,农杆菌 LBA4404 感受态细胞、大肠杆菌 TOP10 感受态细胞、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒、植物基因组 DNA 提取试剂盒、pGM-T 试剂盒均购自天根生化科技有限公司。

1.2 酶和生化药品

氨苄青霉素、利福平、卡那霉素、X-Gal、IPTG、乙酰丁香酮、头孢霉素和 PMSF 购自天根生化科技有限公司;潮霉素 B 购自北京索莱宝科技有限公司;限制性内切酶和 T4 连接酶购自大连 TaKaRa 公司。

1.3 培养基

LB 培养基、YPG 培养基;共培养基:蛋白胨 10 g/L、葡萄糖 20 g/L、 KH_2PO_4 0.6 g/L、 MgSO_4 0.5 g/L、盐酸噻胺 5~10 mg/L,固体培养基添加琼脂粉 15 g/L,于 110 °C 灭菌 30 min;PDA 加富培养基:去皮马铃薯 250 g/L、葡萄糖 20 g/L、 KH_2PO_4 3 g/L、 MgSO_4 11.5 g/L、盐酸噻胺 20~30 mg/L,固体培养基添加琼脂粉 15 g/L,纱布过滤,于 110 °C 灭菌 30 min。

1.4 PCR 引物

根据已知基因序列,通过 Primer 5.0 设计引物(表 1),由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 常规 PCR 所用引物及序列

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'-3')
<i>FIP-fve</i> -F	AGGATCCATGTCGCCACGTCGCTCAC
<i>FIP-fve</i> -R	TGAAGCTTTTACTTCTTCCACTCAGCGATG
<i>pGPD</i> -F	TGAATTCCTAGACTCTTGCTGGTACTGGG
<i>pGPD</i> -R	GAGCTCGATTGTAGATGAGGAGATGG
<i>HYG</i> -F	ATGAAAAAGCCTGAACTCACC GCGAC
<i>HYG</i> -R	CTATTTCTTTGCCCTCGGACGAG

1.5 目的片段的基因克隆

提取野生型金针菇(白色金针菇,沈农金 001)子实体基因组,用 *FIP-fve* 上下游引物扩增 *FIP-fve* 基因。反应程序:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。用金针菇内源启动子 *pGPD* 基因的上下游引物扩增 *pGPD* 基因,反应程序:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电

泳检测。

1.6 pCAMBIA1301-pGPD-fve 的载体构建

将 *FIP-fve* 基因和启动子 *pGPD* 基因分别与 T 载体连接,测序。载体 pGM-T-pGPD 和 pCAMBIA1301 分别用 *EcoR* I 和 *Sac* I 进行双酶切,回收、连接、转化。用 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别对重组载体 pCAMBIA1301-pGPD 和 pGM-T-*FIP-fve* 进行双酶切,回收、连接、转化获得 pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve*。进行琼脂糖凝胶电泳检测。将重组载体转入农杆菌 LBA4404,菌落 PCR 检测潮霉素基因,提取阳性转化子质粒回转大肠杆菌 TOP10 验证。

1.7 农杆菌 LBA4404 介导的金针菇遗传转化

参照文献[11]中金针菇遗传转化方法,采用含有 pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve* 的农杆菌 LBA4404 作为供体介导转化金针菇菌丝体。对超表达 *FIP-fve* 基因的金针菇拟转化子进行传代培养。

1.8 金针菇拟转化子 PCR 和实时定量 PCR 检测

取传代培养后金针菇转化子 0.2 g 用植物 DNA 提取试剂盒提取基因组,进行潮霉素基因 PCR 检测,反应程序:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。统计阳性转化子数,计算农杆菌 LBA4404 介导转化金针菇的转化效率。根据已知基因序列,通过 Primer 5.0 设计 qPCR 引物,上海生工公司合成(表 2)。每个样品设置 3 个重复,并计算平均阈值循环(CT)值,使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算相对表达水平。

表 2 实时定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequence for q-RT PCR

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'-3')
Gap-RBP2-F	GAATGGCGTTTGGATGGG
Gap-RBP2-R	TGTCACGGACGACGGATA
Gap- β -tub-F	CGATACCGTCGTTGAGCC
Gap- β -tub-R	TGAGCGTCCTGAAGCAAA
Fve-18s Rma-F	TGATGTGTTGTTCCGGCAC
Fve-18s Rma-R	AGTTATGTCTGGACCTGG

1.9 金针菇培养

超表达 *FIP-fve* 基因的金针菇命名为 pGPD:*FIP-fve*,将 *FIP-fve* 基因沉默的金针菇命名为 RNAi:*FIP-fve*,野生金针菇命名为 CK。取 3 种菌丝接种于 YPG 培养基培养,每隔 3 d 观察菌丝生长状况,生长 8 d 时对菌丝生长直径进行测量。取 3 种菌丝接种于试管中 PDA 斜面培养基上,25 °C 恒温黑暗培养 7 d,送

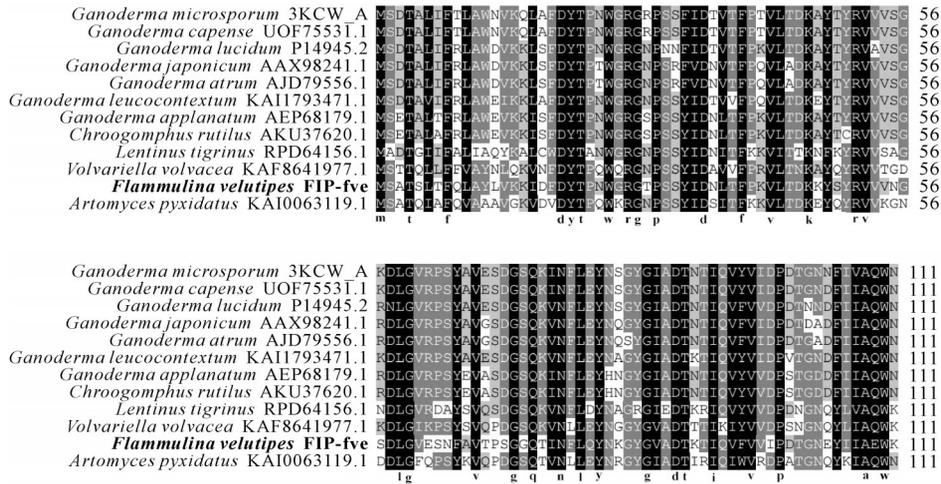
至沈阳农业大学食用菌研究所培养生长成子实体。期间每隔 7 d 记录和观察金针菇的生长发育情况。

2 结果与分析

2.1 *FIP-fve* 序列分析和系统发育分析

FIP-fve 基因的编码序列长为 342 bp, 无内含子, 编码 113 个氨基酸残基的蛋白质 (GenBank 登录号

ADB24832.1), 具有典型的 FIP 家族蛋白质的保守序列, 包括 DYT、YID、VYV 等 (图 1)。对 13 种真菌 (12 种伞菌纲的真菌和 1 种外群子囊菌门真菌) 中的 FIP 蛋白进行系统发育分析, 结果显示, *FIP-fve* 和其他 FIP 蛋白定位在进化枝伞菌纲 (Agaricomycetes) 中, 说明金针菇 *FIP-fve* 是一种典型的 FIP 蛋白, 并且在伞菌纲中是相对保守的。



3KCW_A, UOF75531.1, P14945.2, AAX98241.1, AJD79556.1, KAI1793471.1, AEP68179.1, AKU37620.1, RPD64156.1, KAF8641977.1, *FIP-fve* 和 KAI0063119.1 分别来自小孢子灵芝、薄树芝、赤灵芝、紫灵芝、黑灵芝、白肉灵芝、树舌灵芝、血红铆钉菇、虎皮香菇、草菇、金针菇和杯珊瑚菌。相同的氨基酸残基用黑色阴影标记, 而相似的氨基酸残基用灰色阴影标记。3KCW_A, UOF75531.1, P14945.2, AAX98241.1, AJD79556.1, KAI1793471.1, AEP68179.1, AKU37620.1, RPD64156.1, KAF8641977.1, *FIP-fve*, KAI0063119.1 are from *Ganoderma microsporum*, *G. capense*, *G. lucidum*, *G. japonicum*, *G. atrum*, *G. leucocontextum*, *G. applanatum*, *Chroogomphidius rutilus*, *Lentinus tigrinus*, *Volvariella volvacea*, *F. velutipes* and *Artomyces pyxidatus*, respectively. The same amino acid residues are marked with black shadow, while similar amino acid residues are marked with gray shadow.

图 1 担子菌门不同真菌的 FIP 序列比对

Fig.1 FIP sequence alignment of different fungi in Basidiomycetes

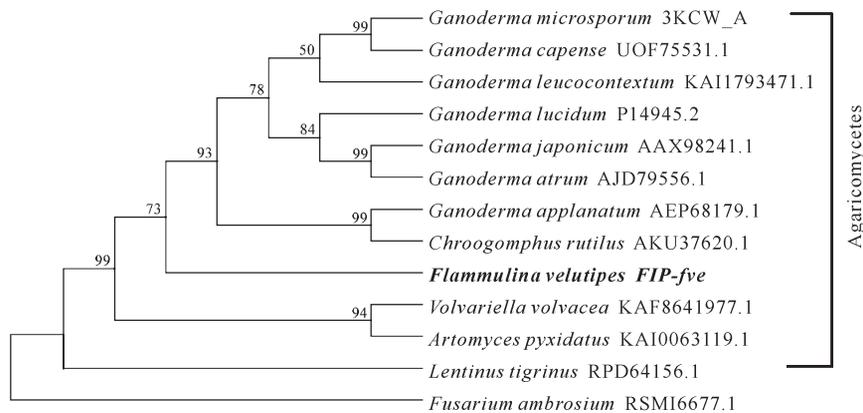


图 2 FIP 的系统发育进化树

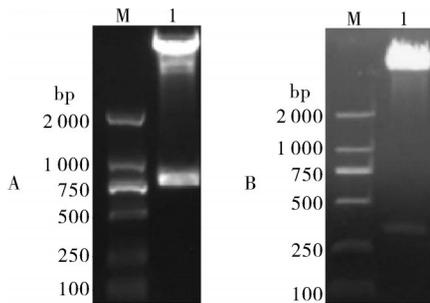
Fig.2 The phylogenetic tree of FIP

2.2 pCAMBIA1301-pGPD-FIP-fve 构建

将克隆的内源启动子 *pGPD* 基因和 *FIP-fve* 基因分别连接到 pGM-T 载体上, 测序证明正确后, 将重

组载体 pGM-T-pGPD 和 pCAMBIA1301 载体同时用 *EcoR* I 和 *Sac* I 进行双酶切, 回收目的片段, 连接, 转化, 对长出的菌落进行菌落 PCR 鉴定和摇菌、

抽提质粒后用 *EcoR* I 和 *Sac* I 双酶切检测。酶切结果显示,与已知克隆片段大小一致,成功获得 pCAMBIA1301-pGPD 载体(图 3A)。用 *Bam* H I 和 *Hind* III 分别对重组载体 pGM-T-*FIP-fve* 和 pCAMBIA1301-pGPD 进行双酶切,回收,连接,转化。对菌落进行 PCR 鉴定,抽提质粒,进行双酶切检测。酶切结果和已知克隆片段大小一致,成功构建金针菇 *FIP-fve* 基因的超表达载体:pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve*(图 3B)。



A: 表达载体 pCAMBIA1301-pGPD 鉴定 (M: DL2000 DNA marker; 1: 表达载体 pCAMBIA1301-pGPD 酶切检测); B: 表达载体 pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve* 鉴定 (M: DL2000 DNA marker; 1: 表达载体 pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve*)。A: Expression vector pCAMBIA1301-pGPD identification map (M: DL2000 DNA marker; 1: Restriction analysis of expression vector pCAMBIA1301-pGPD); B: Expression vector pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve* identification map (M: DL2000 DNA marker; 1: Restriction analysis of expression vector pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve*).

图3 表达载体的酶切检测

Fig.3 Restriction analysis of expression vector

2.3 农杆菌 LBA4404 转化鉴定

分别将重组载体 pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve* 转入农杆菌 LBA4404,对长出的菌落用潮霉素基因进行菌落 PCR 鉴定,筛选出阳性转化子。摇菌抽提质粒回大肠杆菌,提取质粒酶切验证。将农杆菌阳性转化子摇菌保存,用于介导金针菇菌丝体。

2.4 农杆菌 LBA4404 介导的金针菇遗传转化

使用农杆菌 LBA4404 侵染的金针菇菌丝体在含有 12 μg/mL 潮霉素固体 YPG 培养基筛选出拟转化子,提取拟转化子基因组 DNA,进行 PCR 反应,检测潮霉素基因(图 5)。将阳性转化子在含有潮霉素的 YPG 培养基上进行 5 代以上的传代培养之后,依然可以在含有潮霉素的 YPG 培养基上正常生长,表明超表达 *FIP-fve* 金针菇能够稳定遗传。用含有 pCAMBIA 1303-pGPD-*FIP-fve* 表达载体的农杆菌 LBA4404 侵染 40 块金针菇菌丝体,获得阳性转化子 9 个,转化效率为 22.5%。荧光定量 PCR 分析结果显示,获得的 3 个 *FIP-fve* 过表达突变体 *FIP-fve*^{O#23}、*FIP-fve*^{O#28} 和 *FIP-fve*^{O#30} 与野生型相比,它们的 *FIP-fve* 转录水平分别增加了 64.7%、72.3% 和 88%。获得了 3 个 *FIP-fve* 沉默突变体 *FIP-fve*^{R#3}、*FIP-fve*^{R#7} 和 *FIP-fve*^{R#8},其中 *FIP-fve* 转录水平分别比野生型降低了 49.3%、34.3% 和 43.3%(图 6)。上述 6 个突变体菌株用于子实体生长发育的研究。

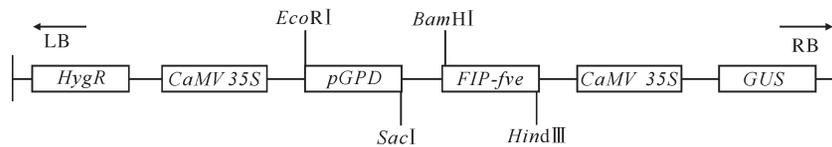
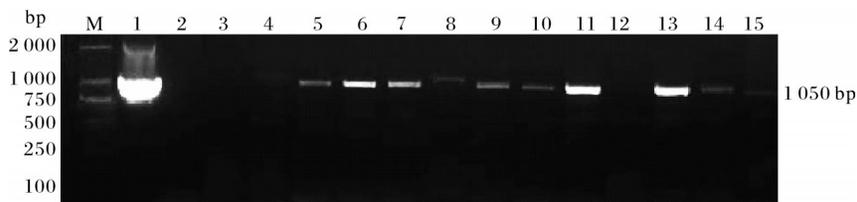


图4 表达载体 pCAMBIA1303-pGPD-*FIP-fve* 构建

Fig.4 pCAMBIA 1303-pGPD-*FIP-fve* vector construction



M: DL2000 DNA marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~15: 转 pCAMBIA1303-pGPD-*FIP-fve* 的金针菇拟转化子。M: DL2000 DNA marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3-15: Transformation of *Flammulina filiformis* with pCAMBIA1303-pGPD-*FIP-fve*.

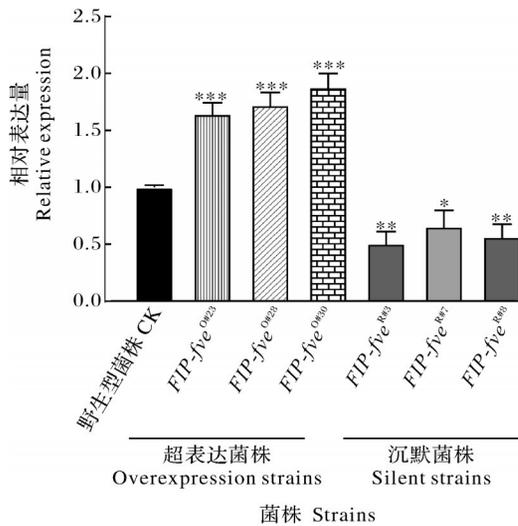
图5 金针菇转化子潮霉素基因 PCR 检测结果

Fig.5 PCR results of hygromycin gene transformed from *Flammulina filiformis*

2.5 金针菇菌丝体和子实体表型分析

1) 金针菇菌丝体。金针菇菌丝体接种于 YPG 培

培养基,于 25 °C 培养 8 d,观察发现金针菇菌丝体生长速度存在明显差异(图 7A),通过测量野生和突变体



误差线表示来自3个独立样本的标准偏差,与野生型样品的显著性统计结果 (** $P < 0.0005$; ** $P < 0.005$; * $P < 0.05$)。Error lines indicate standard deviations from three independent samples, statistically significant compared to wild-type samples (** $P < 0.0005$; ** $P < 0.005$; * $P < 0.05$)。

图6 野生菌株、过表达菌株和沉默菌株中的 *FIP-fve* 的转录水平

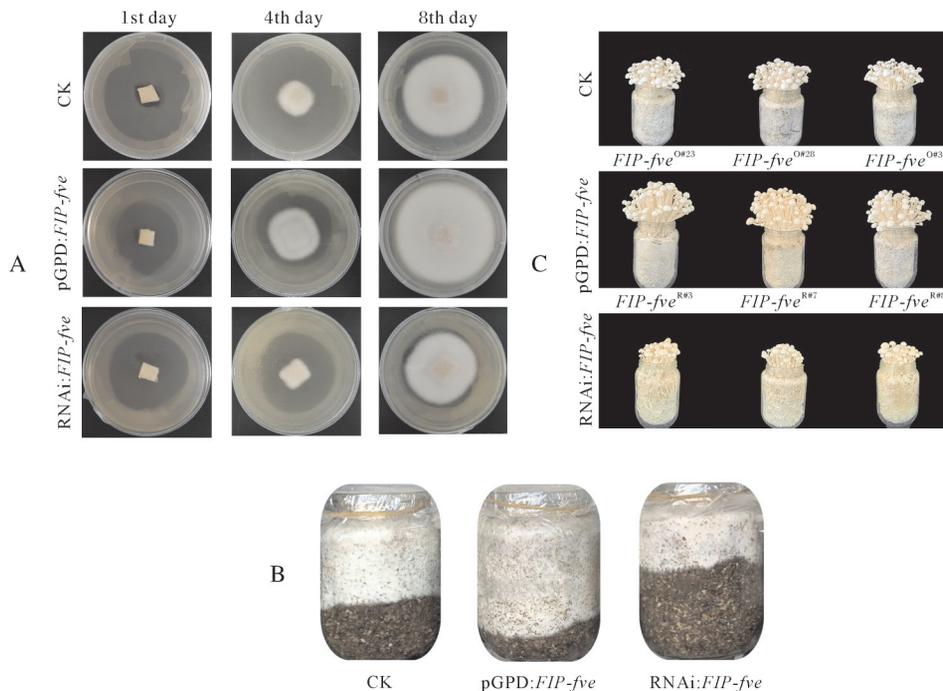
Fig.6 Transcription levels of *FIP-fve* in the wild, overexpressing and silent strains

菌丝的平均生长半径(图8),结果显示,超表达 *FIP-fve* 金针菇菌丝体生长发育速度快于野生金针菇菌丝体,沉默 *FIP-fve* 金针菇菌丝体生长发育速度慢于野生金针菇。

2) 金针菇菌棒。金针菇菌丝体接种于相同的菌棒中于恒温黑暗的条件下生长30 d,发现菌棒之间生长高度存在明显差异(图7B),对培养30 d后野生和突变体菌棒的平均长度进行测量,结果显示,超表达 *FIP-fve* 金针菇菌棒的生长速度快于野生金针菇菌棒,野生金针菇菌棒的生长快于沉默 *FIP-fve* 金针菇菌棒(表3)。

3) 金针菇子实体。培养40 d后的金针菇子实体表型观察(图7C)和测算结果(表3)显示,超表达 *FIP-fve* 金针菇菌棒子实体数量明显多于野生型金针菇菌棒子实体数量,而沉默 *FIP-fve* 金针菇子实体数量最少;而且超表达 *FIP-fve* 金针菇子实体菌柄长度显著大于野生型金针菇子实体菌柄长度,而沉默 *FIP-fve* 金针菇的子实体菌柄最短。说明超表达 *FIP-fve* 基因能提高金针菇的子实体的数量和菌柄长度。

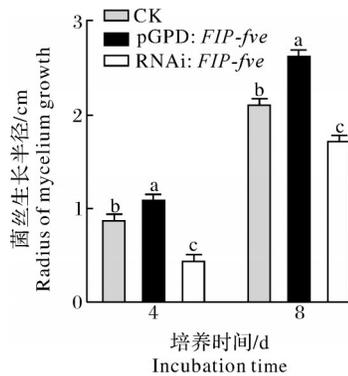
称取每个培养瓶中全部金针菇子实体质量(表3),发现单个菌棒中超表达 *FIP-fve* 金针菇子实体质



A: 金针菇在 YPG 培养基生长第 1、4、8 天的形态; B: 金针菇菌棒生长 30 d 的形态; C: 金针菇培养 40 d 后的子实体情况。CK: 野生型菌株; pGPD: *FIP-fve*: 过表达菌株; RNAi: *FIP-fve* 沉默菌株。A: The morphology of *Flammulina filiformis* in YPG medium on the 1st, 4th and 8th day; B: The morphology of *Flammulina filiformis* rod growing for 30 days; C: The morphology of fruiting bodies after forty days. CK: Wild-type strain; pGPD: *FIP-fve*: *FIP-fve* overexpression strain; RNAi: *FIP-fve*: *FIP-fve* silent strains.

图7 *FIP-fve* 正向调控金针菇的生长发育

Fig.7 *FIP-fve* positively regulates the growth and development of *Flammulina velutipes*



试验有5次独立重复,不同小写字母表示处理间有显著差异。The experiment was repeated five times independently. Lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

图8 *FIP-fve*过表达和沉默对菌丝体生长的影响

Fig.8 Effect of *FIP-fve* overexpression and silent on mycelium growth

表3 野生型(CK)、*FIP-fve*过表达和沉默菌株的金针菇产量

Table 3 The mushroom yield of wild-type (CK), *FIP-fve* overexpression and silent strains

菌株 Strains	菌棒长 度/cm Length of sticks	子实体 数量 Number of fruiting bodies	菌柄长 度/cm Length of fruiting bodies	子实体 质量/g Weight of fruiting bodies	生物学 效率/% Biological efficiency
CK	6.75± 0.45b	134± 12b	8.78± 0.15b	104.44± 5.59b	53.56± 2.85b
pGPD: <i>FIP-fve</i>	8.12± 0.56a	175± 7a	9.56± 0.16a	161.66± 20.70a	82.9± 10.62a
RNAi: <i>FIP-fve</i>	5.62± 0.59c	62± 4c	6.98± 0.19c	47.68± 5.14c	24.45± 2.64c

量均显著高于野生金针菇子实体,沉默*FIP-fve*金针菇子实体质量最小,表明超表达*FIP-fve*基因能提高金针菇的产量。从表3还可以看出,超表达*FIP-fve*金针菇子实体的生物学效率明显高于野生金针菇子实体的生物学效率,沉默*FIP-fve*金针菇子实体生物学效率最低,表明超表达*FIP-fve*基因能提高金针菇子实体的生物学效率。

3 讨论

农杆菌介导的遗传转化已经成功地用于多种丝状真菌的转化,并可用于基因的沉默或过表达的研究^[12]。农杆菌介导的转化方法有着转化受体的多样化、产生稳定的转化体、高转化效率和高单拷贝插入和产生敲入突变等诸多优势,已成为研究金针菇基因功能的首选方法^[13]。这种方法已经在很多药用真菌上实现了以菌丝体、原生质体和分生孢子作为

受体的遗传转化^[14]。农杆菌转化金针菇菌丝体主要受到乙酰丁香酮浓度、根癌农杆菌菌株和金针菇的亲合性、共同培养条件等因素影响^[15]。本研究以农杆菌LBA4404介导转化金针菇菌丝体,以200 μmol/L的乙酰丁香酮在25 °C的条件下诱导农杆菌Ti质粒携带T-DNA整合入金针菇基因组。共同培养基共培养72 h,获得了超表达*FIP-fve*基因的金针菇并可以稳定遗传,pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve*转化金针菇的效率为22.5%,而pTCK303-*fve(R)-fve(F)*转化金针菇的效率为8.33%^[15],令人惊奇的是相同的转化方法转化效率却大相径庭。我们推测启动子的不同可能是导致转化效率不同的主要原因,金针菇的内源启动子可能有利于T-DNA整合入金针菇基因组。近年来,发现在农杆菌介导的单子叶植物遗传转化中所选用的植物标记基因和基因的启动子也是影响转化效率的因素之一^[16],今后可通过使用真菌内源启动子探究真菌农杆菌介导转化食用真菌的作用机制。

有研究表明,小G蛋白Ran编码基因*FvRan1*、寡肽转运蛋白编码基因*fvopt1*和*fvopt2*、转运蛋白编码基因*fv-msf1*等基因在金针菇的菌丝、原基以及子实体不同生长阶段中起调控作用^[17]。仝宗军等^[18]对金针菇子实体不同发育阶段以及菌盖不同发育时期的金针菇转运蛋白基因*fv-msf1*表达量进行分析,结果显示该基因在金针菇菌盖的生长过程中高表达,表明该基因在金针菇菌盖发育中有一定的调节作用。我们对金针菇全生长过程进行观察,发现超表达*FIP-fve*基因金针菇均优于野生金针菇,表明*FIP-fve*参与了金针菇生长的整个过程,*FIP-fve*可能是金针菇生长过程中的关键基因。Wu等^[19]在金针菇中发现了1个具有HMG-box结构域的转录因子*pdd1*,RNA干扰*pdd1*基因的菌株菌丝生长缓慢,过表达*pdd1*基因的菌株会更早地形成原基、更快地到达成熟期,结合转录组学分析发现*pdd1*基因通过调控凝集素编码基因和信息素受体编码基因来调节金针菇的生长发育。沉默金针菇中编码WD40蛋白的*Fvcpc2*基因导致编码腺苷酸环化酶和蛋白激酶A催化亚基的基因的转录水平显著降低,菌丝生长速度比野生型慢。沉默*Fvcpc2*还减弱了凝集素编码基因、疏水蛋白编码基因对性发育诱导的转录反应,并且破坏了子实体的形成。过表达菌株均表现为金针菇产量的增加和培养时间的缩短,说明*Fvcpc2*基因正向调控金针菇的生长发育^[20]。巧合的是,本研究

发现超表达 *FIP-fve* 的金针菇菌丝体和菌棒的生长速度明显快于沉默 *FIP-fve* 基因的金针菇, 略快于野生型金针菇; 超表达 *FIP-fve* 的金针菇菌棒的出菇数量和子实体质量明显高于沉默 *FIP-fve* 基因的金针菇, 略高于野生型金针菇: 说明 *FIP-fve* 表达量的升高对金针菇的生长有促进作用, 然而其作用机制还不清楚。今后将结合转录组学对金针菇生长的4个时期进行分析, 了解 *FIP-fve* 对金针菇生长发育的作用机制。目前在食用菌生长发育过程中主要的参考基因有疏水蛋白编码基因、凝集素编码基因、转录因子编码基因、漆酶基因。本研究通过农杆菌侵染的方法获得了超表达 *FIP-fve* 的金针菇和 *FIP-fve* 的基因沉默金针菇, 通过对超表达、沉默 *FIP-fve* 的金针菇和野生型金针菇从菌丝体到子实体的生长全过程的观察, 发现 *FIP-fve* 对于金针菇本身的生长发育起到正调控的作用, 推测真菌免疫调节蛋白对真菌的生长发育有一定的促进作用, *FIP* 可能成为食用菌生长发育的主要参考基因之一。

参考文献 References

- [1] AL-KHALIFA H. Immunological techniques in avian studies[J]. World's poultry science journal, 2016, 72(3): 573-584.
- [2] MAHFUZ S, HE T F, MA J Y, et al. Mushroom (*Flammulina velutipes*) stem residue on growth performance, meat quality, antioxidant status and lipid metabolism of broilers[J]. Italian journal of animal science, 2020, 19(1): 803-812.
- [3] ADAMS S, CHE D S, JIANG H L, et al. Effects of pulverized oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on diarrhea incidence, growth performance, immunity, and microbial composition in piglets[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2019, 99(7): 3616-3627.
- [4] GHIMIRE P S, JIN C. Genetics, molecular, and proteomics advances in filamentous fungi[J]. Current microbiology, 2017, 74(10): 1226-1236.
- [5] LI D D, TANG Y, LIN J, et al. Methods for genetic transformation of filamentous fungi[J]. Microbial cell factories, 2017, 16(1): 1-13.
- [6] LI Q Z, ZHENG Y Z, ZHOU X W. Fungal immunomodulatory proteins: characteristic, potential antitumor activities and their molecular mechanisms[J]. Drug discovery today, 2019, 24(1): 307-314.
- [7] LI L D, MAO P W, SHAO K D, et al. *Ganoderma* proteins and their potential applications in cosmetics[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2019, 103(23): 9239-9250.
- [8] EJIKE U C, CHAN C J, OKECHUKWU P N, et al. New advances and potentials of fungal immunomodulatory proteins for therapeutic purposes[J]. Critical reviews in biotechnology, 2020, 40(8): 1172-1190.
- [9] KO J L, HSU C I, LIN R H, et al. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence[J]. European journal of biochemistry, 1995, 228(2): 244-249.
- [10] LEE Y T, WU C T, SUN H L, et al. Fungal immunomodulatory protein-fve could modulate airway remodel through by affect IL17 cytokine[J]. Journal of microbiology, immunology and infection, 2018, 51(5): 598-607.
- [11] 张昕, 夏雪, 段作文, 等. *FIP-fve* 基因沉默载体构建和金针菇的遗传转化[J]. 分子植物育种, 2017, 15(11): 4491-4497. ZHANG X, XIA X, DUAN Z W, et al. Construction of silencing vector for *FIP-fve* gene and genetic transformation of enoki mushroom (*Flammulina velutipes*) [J]. Molecular plant breeding, 2017, 15(11): 4491-4497 (in Chinese with English abstract).
- [12] ZHOU J S, BAI Y, DAI R J, et al. Improved polysaccharide production by homologous co-overexpression of phosphoglucomutase and UDP glucose pyrophosphorylase genes in the mushroom *Coprinopsis cinerea* [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2018, 66(18): 4702-4709.
- [13] MICHIELSE C B, HOOYKAAS P J J, VAN DEN HONDEL C A M J J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. Current genetics, 2005, 48(1): 1-17.
- [14] 黄亚丽, 潘玮, 蒋细良, 等. 根癌农杆菌介导丝状真菌遗传转化的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(3): 111-114. HUANG Y L, PAN W, JIANG X L, et al. Transformation in filamentous fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Biotechnology bulletin, 2007(3): 111-114 (in Chinese with English abstract).
- [15] KIM S, HA B S, RO H S. Current technologies and related issues for mushroom transformation [J]. Mycobiology, 2015, 43(1): 1-8.
- [16] CHENG M, LOWE B A, SPENCER T M, et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species [J]. In vitro cellular & developmental biology-plant, 2004, 40(1): 31-45.
- [17] 张磊, 全宗军, 严俊杰, 等. 金针菇小G蛋白Ran的序列特征与表达分析[J]. 食用菌学报, 2018, 25(1): 13-19, 127. ZHANG L, TONG Z J, YAN J J, et al. Characterization and expression analysis of a FvRan1 gene from *Flammulina velutipes* [J]. Acta edulis fungi, 2018, 25(1): 13-19, 127 (in Chinese with English abstract).
- [18] 全宗军, 严俊杰, 张磊, 等. 金针菇转运蛋白基因 *fv-mfs1* 的序列与表达分析[J]. 食用菌学报, 2017, 24(3): 1-6, 107. TONG Z J, YAN J J, ZHANG L, et al. Sequence and expression analysis of transporter protein gene *fv-mfs1* in *Flammulina velutipes* [J]. Acta edulis fungi, 2017, 24(3): 1-6, 107 (in Chinese with English abstract).
- [19] WU T J, HU C C, XIE B G, et al. A single transcription factor (PDD1) determines development and yield of winter mushroom

- (*Flammulina velutipes*) [J/OL]. Applied and environmental microbiology, 2019, 85(24): e01735-19[2022-08-03]. <https://doi.org/10.1128/AEM.01735-19>.
- [20] WU T J, ZHANG Z Y, HU C C, et al. A WD40 protein encoding gene *Fvcp2* positively regulates mushroom development and yield in *Flammulina velutipes* [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2020, 11:498[2022-08-03]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00498>.

Native bio-function of *FIP-fve* towards *Flammulina filiformis*

CHEN Huan¹, FAN Tianning¹, BAI Yudong¹, GUO Qianqian¹,
WANG Haoan¹, CHEN Gang², GAO Yingxu², LIN Jingwei¹

1. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University,
Shenyang 110866, China;

2. Liaoning Academy of Forestry Sciences, Shenyang 110032, China

Abstract *FIP-fve* is a low molecular-mass protein identified from *Flammulina filiformis*, which has many biological activities including immunomodulation. Our previous studies found that *FIP-fve* had certain growth-promoting effect on *F. filiformis* mycelia. We constructed an over-expression vector pCAMBIA1301-pGPD-*FIP-fve*, and transformed it into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain to study the native biological function of *FIP-fve* to *F. filiformis*. *FIP-fve* gene overexpressed *F. filiformis* was obtained via *Agrobacterium* transformation. By comparing the biological characteristics of *FIP-fve* gene-silent *F. filiformis* (RNAi: *FIP-fve*), *FIP-fve* gene-overexpressed *F. filiformis* (pGPD: *FIP-fve*) and wild *F. filiformis* (CK) in mycelium and fruiting body stages, we found that the growth speed of pGPD: *FIP-fve* was faster than that of CK, whereas the growth speed of RNAi: *FIP-fve* was the lowest. After cultivating the fruiting body, yield-related traits of pGPD: *FIP-fve* were significantly better than that of CK in terms of fruiting body numbers, stalk length, fruiting body yield and biological efficiency, and those traits of RNAi: *FIP-fve* were the worst. It is indicated that *FIP-fve* significantly promote the growth of *F. filiformis* mycelia and affect the final yields of *F. filiformis*.

Keywords *Flammulina filiformis*; fungal immunoregulatory proteins; gene-silencing; overexpression vectors; genetic transformation

(责任编辑:张志钰)