

• 药材与资源 •

灵芝中 C₂H₂ 锌指蛋白家族全基因组鉴定及表达分析

刘力维¹, 宋鸿雁¹, 杨 湾¹, 何心雨¹, 李振皓^{2,4}, 杨继鸿^{2,4}, 李依鸿¹, 李 威¹, 杨宗岐¹, 杨东风^{1,3*}

1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 浙江省植物次生代谢调控重点实验室, 浙江 杭州 310018

2. 浙江寿仙谷植物药研究院有限公司, 浙江 杭州 311121

3. 浙江理工大学绍兴生物医药研究院有限公司, 药食同源保健食品开发技术浙江省工程研究中心, 浙江 绍兴 312366

4. 全省食用菌生物育种与综合开发利用重点实验室, 浙江 金华 321200

摘要: 目的 基于灵芝 *Ganoderma lucidum* 的基因组和转录组数据, 挖掘灵芝 C₂H₂ 型锌指转录因子 (C₂H₂-ZFPs) 基因家族成员, 并分析其菌丝在茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 诱导后的表达模式, 以期发现在灵芝的生长发育、胁迫应对及次生代谢等方面起作用的 C₂H₂-ZFPs。方法 通过隐马尔可夫模型搜索和保守结构域分析, 对灵芝中的 C₂H₂ 转录因子进行全基因组鉴定, 利用 Peptides 软件包分析 C₂H₂-ZFPs 的理化性质, 利用 IQtree 构建 C₂H₂ 锌指蛋白系统发育树, 利用 MEME 和 GSDS 2.0 在线工具分析保守基序和基因结构, 利用 qRT-PCR 测定 MeJA 诱导后菌丝中 C₂H₂ 基因的相对表达量。结果 灵芝中含有 20 个 C₂H₂ 型基因家族成员 (*GLC₂H₂.01* ~ *GLC₂H₂.20*), 可分为 5 个亚群, 分布在灵芝的 10 条染色体上。系统发育和保守基序显示灵芝中 C₂H₂ 转录因子具有进化上的保守性, 且至少含有 1 个 zf-C₂H₂, 启动子区预测分析发现了多类激素及逆境响应顺式作用元件。转录组分析结果表明 C₂H₂ 基因在灵芝原基期表达最高, 在孢子粉中几乎不表达。MeJA 诱导 9 h 后, 菌丝中 *GLC₂H₂.11* 和 *GLC₂H₂.20* 表达显著下降, 其他 *GLC₂H₂* 在处理 3~9 h 呈下降趋势, 12 h 后恢复至正常表达水平。结论 从灵芝全基因组中系统鉴定了 C₂H₂ 转录因子家族基因, 为进一步研究 C₂H₂ 转录因子在调控灵芝发育及次生代谢方面的生物学功能提供理论参考。

关键词: 灵芝; C₂H₂ 转录因子; 生物信息学; 全基因组鉴定; 表达分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)16-5609-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.022

Genome-wide identification and expression analysis of C₂H₂ zinc finger protein family in *Ganoderma lucidum*

LIU Liwei¹, SONG Hongyan¹, YANG Wan¹, HE Xinyu¹, LI Zhenhao^{2,4}, YANG Jihong^{2,4}, LI Yihong¹, LI Wei¹, YANG Zongqi¹, YANG Dongfeng^{1,3}

1. Zhejiang Key Laboratory of Plant Secondary Metabolism and Regulation, College of Life Science and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

2. Zhejiang Shouxiangu Botanical Drug Institute Co., Ltd., Hangzhou 311121, China

3. Zhejiang Engineering Research Center for Development Technology of Medicinal and Edible Health Food, Shaoxing Academy of Biomedicine Co., Ltd. of Zhejiang Sci-Tech University, Shaoxing 312366, China

4. Zhejiang Key Laboratory of Biological Breeding and Comprehensive Development and Utilization of Edible and Medicinal Mushrooms, Jinhua 321200, China

Abstract: Objective Based on the genome and transcriptome data of *Ganoderma lucidum*, this study aims to explore the members of the C₂H₂ zinc finger proteins (C₂H₂-ZFPs) gene family in *G. lucidum*, and analyze their expression patterns in mycelium induced by methyl jasmonate (MeJA), in order to discover C₂H₂-ZFPs that play a role in the growth and development, stress response, and secondary metabolism of *G. lucidum*. **Methods** Genome-wide identification of C₂H₂ transcription factors in *G. lucidum* was carried

收稿日期: 2024-02-02

基金项目: 浙江省自然科学基金/杭州市联合基金/重点项目 (LHZSZ24H280003); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2021C02074, 2021C02073); “十四五”国家重点研发计划项目 (2023YFD1201604-1)

作者简介: 刘力维 (2000—), 男, 主要从事灵芝次生代谢方面研究。Tel: 13016733430 E-mail: llw20001230@163.com

*通信作者: 杨东风, 教授, 主要从事药用植物次生代谢调控方面研究。Tel: 15057190968 E-mail: ydf807@sina.com

out by Hidden Markov Model search and conserved structural domain analysis, physicochemical properties of C₂H₂-ZFPs were analyzed by Peptides software package, phylogenetic tree of C₂H₂ zinc finger proteins was constructed by using IQtree, and the conserved motifs and gene structures were analyzed by using MEME and GSDS2.0 online tools, and the relative expression of C₂H₂ gene in mycelium after MeJA induction was determined by qRT-PCR. **Results** *G.lucidum* contains 20 C₂H₂-type gene family members (*GIC₂H₂.01*—*GIC₂H₂.20*), which can be categorized into five subgroups and distributed on 10 chromosomes of *G.lucidum*. Phylogenetic and conserved motifs revealed that C₂H₂ transcription factors in *G.lucidum* are evolutionarily conserved and contain at least one zf-C₂H₂, and promoter region prediction analysis identified multiple classes of hormones and adversity-responsive cis-acting elements. Transcriptome analysis results showed that C₂H₂ gene was most highly expressed in the primary base stage of *G.lucidum*, and was hardly expressed in sporopollen. The expression of *GIC₂H₂.11* and *GIC₂H₂.20* in the mycelium was significantly decreased after 9 h of MeJA induction, and the other *GIC₂H₂* showed a decreasing trend from 3 to 9 h of treatment, and then recovered to the normal expression level after 12 h. **Conclusion** The systematic identification of C₂H₂ transcription factor gene family from the whole genome of *G. lucidum* provides a theoretical reference for further research on the biological functions of C₂H₂ transcription factors in regulating the development and secondary metabolism of *G. lucidum*.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.; C₂H₂ transcription factors; bioinformatics; genome-wide identification; expression analysis

灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 是多孔菌科 (Polyporaceae)、灵芝属 *Ganoderma* Karst. 的一种大型担子菌, 同人参、冬虫夏草等并称为“中华九大仙草”, 作为药食同源的中药材在中国和东南亚国家有着悠久的历史^[1]。《中国药典》2020 年版一部记载灵芝具有补气安神、止咳平喘的功效^[2]。灵芝多糖、灵芝三萜^[3]、灵芝腺苷是灵芝中的主要活性成分, 具有抗炎、镇痛、抗衰老、抗肿瘤、抗缺氧、降低血液黏度等功效^[4-5]。

近年来, 对灵芝的研究集中在液态发酵培养^[6]、次生代谢产物生物合成、生长发育、活性成分提取工艺等领域。随着灵芝基因组测序的完成, 越来越多的研究开始从基因组、代谢组角度解析灵芝次生代谢产物合成途径, 挖掘功能基因对灵芝三萜等成分生物合成的调控机制。例如, 林嘉龙等^[7]发现编码泛素蛋白和抑肽酶基因 *GL23307*、*GL25546* 在乙烯调控灵芝三萜酸生物合成过程中发挥重要作用; Fei 等^[8]发现 *FPS* 基因的过表达是提高灵芝三萜酸产量的有效策略; 赵明文等^[9]报道通过沉默灵芝菌丝体中 *SKN7* 基因, 能提高灵芝三萜的生物合成量和抑制灵芝菌丝的生长; 朱静等^[10]发现在灵芝转录因子 *AreA* 基因的沉默菌株中, 灵芝三萜的含量会下降。此外, 有研究表明, 次级代谢产物的合成可能与真菌发育有关, 以响应各种非生物或生物外部刺激, 例如 Velvet 复合体和 CBC 复合体在灵芝发育与次生代谢转录调控中有着重要作用^[11]。

锌指蛋白 (Zinc finger protein, ZFP) 是真核生物基因组中最大的转录因子家族之一^[12], 参与 DNA 识别、转录激活、蛋白质翻译等过程。“锌指”是指

含有由半胱氨酸 (C) 和组氨酸 (H) 残基组成的保守结构域的蛋白质。该结构域与锌离子结合, 在结构上由 1 个双链反平行 β -折叠和 1 个螺旋组成^[13]。锌指蛋白根据其在保守结构域中的 C 和 H 残基的数量和位置可分为以下几类: C₂H₂、C₂HC、C₂HC₅、C₂C₂、C₃H、C₃HC₄、C₄、C₄HC₃、C₆ 和 C₈^[14]。其中 C₂H₂ 型锌指蛋白 (C₂H₂-ZFPs) 的研究最为广泛。这些蛋白质中的锌指结构域包含 2 个 C 和 2 个 H, 其保守序列通常为 C_X (2~4) C_{X12}H_X (3~5) H (其中 X 代表任何氨基酸)^[15]。最早的 C₂H₂ 型锌指蛋白是 1985 年在非洲爪蟾中发现的^[16]。真菌中 C₂H₂ 型锌指转录因子参与菌体发育和次生代谢调控等多个生命活动。例如核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 菌株中的 1 个 C₂H₂ 转录因子的缺失导致菌丝生长速率减缓^[17]; 胶孢炭疽菌中 C₂H₂ 转录因子 *CgGcp1* 参与调控营养生长、分生孢子产生、附着胞形成与侵入和致病性^[18]。近年来, 平菇^[19]、冬虫夏草^[20]等大型真菌中的 C₂H₂ 型锌指转录因子家族已经完成全基因组水平鉴定, 但是灵芝中 C₂H₂ 型锌指转录因子家族的鉴定和功能尚未报道。

本研究在灵芝基因组中鉴定了灵芝 C₂H₂ (*GIC₂H₂*) 转录因子家族, 并对其蛋白理化性质、基因结构、保守基序、进化关系以及启动子上游序列中的顺式作用元件等进行预测分析。根据灵芝菌丝期、原基期、开伞期、成熟期、子实体时期以及孢子粉的转录组数据, 分析这些基因在灵芝 6 个生长阶段的表达模式, 同时检测了菌丝在外源激素茉莉酸甲酯 (methyljasmonate, MeJA) 诱导下 *GIC₂H₂* 的差异表达情况, 为灵芝中 C₂H₂ 转录因子的功能研究奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

灵芝菌株由浙江寿仙谷植物药研究院有限公司提供,经浙江寿仙谷植物药研究院有限公司李振皓博士鉴定为多孔菌科灵芝属真菌赤芝 *G. lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.。本实验选取 3 株灵芝菌株进行取样,灵芝样品在以下 6 个生长阶段采集:菌丝期、原基期、开伞期、成熟期、子实体、孢子粉。将每个灵芝样品的一部分转移到液氮中,在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存。灵芝菌丝在葡萄糖马铃薯固体培养基上生长, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 10 d,用于后续实验。

1.2 试剂

灵芝总 RNA 提取试剂盒为南京诺唯赞公司生物多糖多酚植物提取试剂盒(RC411),反转录试剂盒为艾柯瑞公司 EvoM-MLV 反转录预混型试剂盒(AG11728),荧光定量 PCR 试剂盒为 AG 公司 SYBR[®]Green Pro Taq HS 预混型 qRT-PCR 试剂盒(AG11718)。实验所用引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

2 方法

2.1 *GIC₂H₂* 基因家族鉴定及理化性质分析

基于灵芝全基因组数据(GCA_000271565.1)^[21],在 Pfam (<http://pfam.xfam.org/search>) 数据库中获得 *C₂H₂* 转录因子家族(ID: PF00096)的隐马尔可夫模型,利用 hmmsearch 程序筛选含有 *C₂H₂* 转录因子结构的基因作为候选基因,进一步利用 NCBI 数据库的 Batch CD-Search 在线软件筛选并确认 *GIC₂H₂* 转录因子家族。利用 R 中的 Peptides 软件包统计蛋白质分子量和等电点,利用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测该家族成员的亚细胞定位。

2.2 *GIC₂H₂* 染色体定位及基因结构分析

通过分析灵芝基因组和结构注释文件,获取 *GIC₂H₂* 基因家族成员在染色体上的位置信息。利用在线工具 MEME (<http://meme-suite.org/index.html>) 对 *GIC₂H₂* 蛋白的保守基序(Motif)进行预测,Motif 的查找数量设置为 10,其他参数均设置为默认值。利用在线工具 GSDS2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 分析基因结构。以上结果均用 TBtools^[20] 软件可视化。

2.3 *GIC₂H₂* 系统发育及顺式作用元件预测

从 FTFD (<http://ftfd.snu.ac.kr/>) 数据库中下载酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的 *C₂H₂* 转录因子蛋白序列,利用 muscle 程序进行多序列比对,比对

结果输入 IQtree 程序采用最大似然法(Maximum likelihood, ML) Bootstrap 值设置 1 000,将灵芝和酿酒酵母 *C₂H₂* 型锌指蛋白合并构建系统发育树,并用 Evolview (<https://www.evolgenius.info/evolview>) 在线网站其美化。利用 TBtools 软件提取灵芝 *C₂H₂* 基因启动子上游 2 000 bp 的序列,利用在线网站 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对其进行顺式作用元件预测,结果用 TBtools^[22] 可视化。

2.4 *GIC₂H₂* 在灵芝生长不同时期中的表达量分析

基于研究中获得的灵芝孢子粉、菌丝期、原基期、开伞期、成熟期、子实体这 6 个时期的转录组数据,利用 fastp 对数据进行过滤,结合 RSEM、Trinity 软件包获得基因家族的表达矩阵,经过 TMM 样品内标准化后用 R 语言绘制表达量热图。

2.5 MeJA 处理灵芝菌丝后实时荧光定量 PCR 分析

选择固体培养基上生长旺盛的灵芝菌丝,喷洒浓度为 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 溶液,分别处理 0 (对照)、3、6、9、12 h,每组 3 个生物学重复,处理后取灵芝菌丝,检测 *GIC₂H₂* 的表达量是否响应 MeJA 信号。处理后的灵芝菌丝用 RNA 试剂盒提取总 RNA,用反转录试剂盒反转录为 cDNA 后进行 RT-qPCR,所用引物见表 1,内参基因选用 RPL-4,反应体系为:TB Green Premix Ex Taq (含 ROX) $5.0\text{ }\mu\text{L}$,PCR Forward Primer $0.2\text{ }\mu\text{L}$,PCR Reverse Primer $0.2\text{ }\mu\text{L}$,cDNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$,dd₂O $3.6\text{ }\mu\text{L}$;PCR 反应程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、34 s,共 40 个循环,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。基因相对表达量利用 SPSS 进行方差分析。

3 结果与分析

3.1 *GIC₂H₂* 基因鉴定及理化性质

根据 Hmsearch 程序检索结果,进一步利用 NCBI 数据库的 Batch CD-Search 在线软件筛选,去除不含 *C₂H₂* 典型结构域的序列,从灵芝基因组中共鉴定出 20 个 *C₂H₂* 型锌指转录因子,命名为 *GIC₂H₂.01* ~ *GIC₂H₂.20*,这些基因编码的氨基酸序列长度 291 aa (*GIC₂H₂.15*) ~ 1 151 aa (*GIC₂H₂.11*),相对分子质量为 31 551.73 (*GIC₂H₂.15*) ~ 127 674.03 (*GIC₂H₂.11*),蛋白的理论等电点为 4.65 (*GIC₂H₂.12*) ~ 10.71 (*GIC₂H₂.14*),亚细胞预测结果显示,15 个 *GIC₂H₂* 转录因子定位在细胞核中,5 个定位在细胞核和细胞质中,与转录因子亚细胞定位特点一致(表 2)。

表 1 qRT-PCR 引物
Table 1 Primers of genes in qRT-PCR

基因名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (3'-5')
<i>GLC₂H₂.19</i>	CTCCTACAACGGCTCCTA	TCTTCGGTGATAGAGATTCC
<i>GLC₂H₂.11</i>	CAGCAGGAGATGGTTCAG	AAGCGAATGGTGTGGATG
<i>GLC₂H₂.05</i>	GGTGGCTGACAGGAATAC	GGAAGTATATTGAGGCATCTG
<i>GLC₂H₂.20</i>	GATACTATGGCTCGCTTCC	GTTGTCGTAGTGGCTCTC
<i>GLC₂H₂.06</i>	TGTGCCTGACCTGTAAGT	ATCTTCTCGTGCTTCTTCAA
<i>GLC₂H₂.03</i>	GGCAAGCGGAGATTATGG	GTCGGCAGGTGATTGAAC
<i>GLC₂H₂.07</i>	CGAGAACCAGAAGCAGTC	GCGGTAGAAGGTGAAGTC
<i>GLC₂H₂.02</i>	GAGGAGTACGGCTATTATGAT	CGTGTACGGAATGTGGAA
<i>RPL-4</i>	GTCAACAAGGGCGTTCTCTT	ACAGCGTCTTGAGGAAGGT

表 2 灵芝 *C₂H₂* 基因家族基因的理化性质
Table 2 Physicochemical properties of *C₂H₂* gene family in *G. lucidum*

基因名称	基因登录号	染色体定位	起点	终点	氨基酸数	相对分子质量	等电点	亚细胞定位
<i>GLC₂H₂.01</i>	GLA01G000707	GLA01	2 234 504	2 235 918	453	49 910.34	8.91	nucleus
<i>GLC₂H₂.02</i>	GLA05G000940	GLA05	2 938 869	2 941 194	717	77 380.67	9.74	nucleus
<i>GLC₂H₂.03</i>	GLA06G000550	GLA06	1 677 897	1 679 379	347	39 233.73	6.20	nucleus
<i>GLC₂H₂.04</i>	GLA07G000141	GLA07	471 493	475 021	830	88 052.44	6.82	nucleus
<i>GLC₂H₂.05</i>	GLA07G000198	GLA07	663 938	665 584	505	54 568.77	7.12	nucleus、Cyto_nucl
<i>GLC₂H₂.06</i>	GLA07G000388	GLA07	1 215 224	1 218 002	851	91 424.26	7.61	nucleus
<i>GLC₂H₂.07</i>	GLA07G001247	GLA07	3 586 918	3 588 173	399	43 891.30	6.91	nucleus、Cyto_nucl
<i>GLC₂H₂.08</i>	GLA07G001395	GLA07	4 004 949	4 006 416	367	38 955.41	10.48	nucleus
<i>GLC₂H₂.09</i>	GLA08G000031	GLA08	93 605	95 960	716	77 249.29	8.75	nucleus
<i>GLC₂H₂.10</i>	GLA08G001327	GLA08	3 830 843	3 833 292	760	80 524.47	9.17	nucleus
<i>GLC₂H₂.11</i>	GLA09G000336	GLA09	1 015 331	1 019 304	1 151	127 674.03	6.57	nucleus
<i>GLC₂H₂.12</i>	GLA09G000610	GLA09	1 854 642	1 856 573	643	68 809.17	4.65	nucleus
<i>GLC₂H₂.13</i>	GLA10G001102	GLA10	3 270 290	3 272 713	737	78 445.42	5.27	nucleus
<i>GLC₂H₂.14</i>	GLA11G000474	GLA11	1 391 975	1 393 402	345	37 267.23	10.71	nucleus、Cyto_nucl
<i>GLC₂H₂.15</i>	GLA11G000512	GLA11	1 525 427	1 526 494	291	31 551.73	9.45	nucleus
<i>GLC₂H₂.16</i>	GLA11G000859	GLA11	2 634 581	2 637 799	819	91 394.79	6.58	nucleus、Cyto_nucl
<i>GLC₂H₂.17</i>	GLA12G000461	GLA12	1 616 851	1 618 748	583	62 852.06	6.56	nucleus
<i>GLC₂H₂.18</i>	GLA12G000518	GLA12	1 793 746	1 795 114	367	40 777.28	8.31	nucleus
<i>GLC₂H₂.19</i>	GLA13G000269	GLA13	835 000	837 753	800	84 409.77	6.53	nucleus、Cyto_nucl
<i>GLC₂H₂.20</i>	GLA13G001014	GLA13	3 133 089	3 135 992	871	91 265.95	8.30	nucleus

3.2 *GLC₂H₂* 染色体定位及保守结构分析

染色体定位结果显示,灵芝 *C₂H₂* 转录因子家族分布在 10 条染色体上,其中 GLA07 号染色体上分布最多,包含 5 个成员,在 GLA01、GLA05、GLA10 号染色体均只有 1 个(图 1)。在其余染色体上大致均匀分布。

结合灵芝 *C₂H₂* 基因家族 Motif、非编码区(untranslated region, UTR)、CDS、内含子以及进化关系,对基因结构进行可视化分析(图 2)。其中,所有 *GLC₂H₂* 家族成员均含有 Motif 1,表明 Motif 1 是 *GLC₂H₂* 锌指结构域发挥作用的关键,其余 15 个

成员中含有 Motif 2,14 个成员中含有 Motif 3。*GLC₂H₂.02*、*GLC₂H₂.03*、*GLC₂H₂.04*、*GLC₂H₂.07*、*GLC₂H₂.08*、*GLC₂H₂.16*、*GLC₂H₂.18* 所含的保守基序相似,在系统发育关系上也表现出更近的亲缘关系。*GLC₂H₂.09* 与其他成员的亲缘关系较远,可能与其含有一段连续的 Motif 5 有关,行使特定的功能。研究的 20 个基因家族成员基因结构较复杂,内含子数量为 0~10 个,每个成员都至少含有 1 个 zf-*C₂H₂* 的保守结构,最多的 *GLC₂H₂.13* 含有 3 个。根据 seqlogo 展示的序列(图 3),Motif 1 有明显的 zf-*C₂H₂* 结构,与 Motif 2 串联排列,通常 DNA 结合

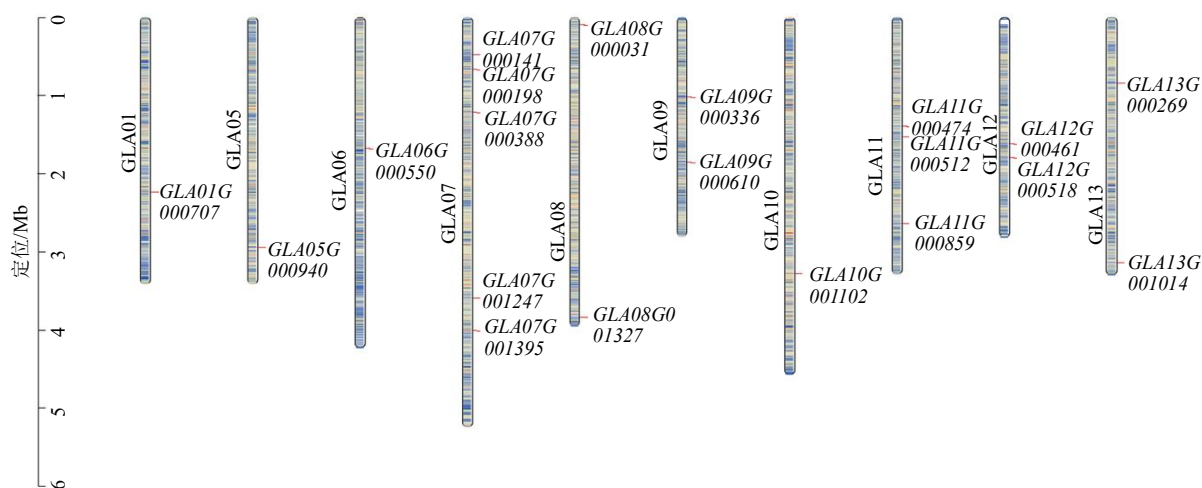


图 1 灵芝 C_2H_2 基因家族基因染色体定位

Fig. 1 Chromosome mapping of C_2H_2 gene family in *G. lucidum*

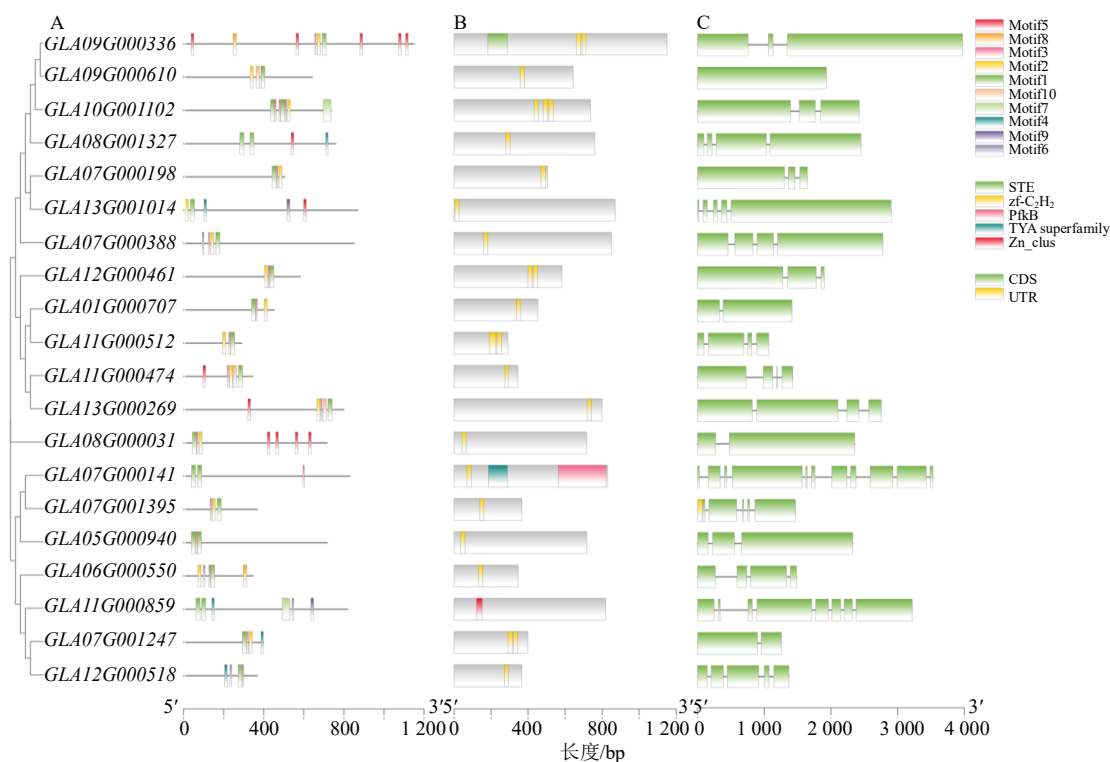


图 2 灵芝 C_2H_2 基因家族成员 Motif (A)、保守结构域 (B)、基因结构 (C) 分析

Fig. 2 Motif (A), conserved structural domain (B), gene structure (C) analysis of members of C_2H_2 gene family in *G. lucidum*

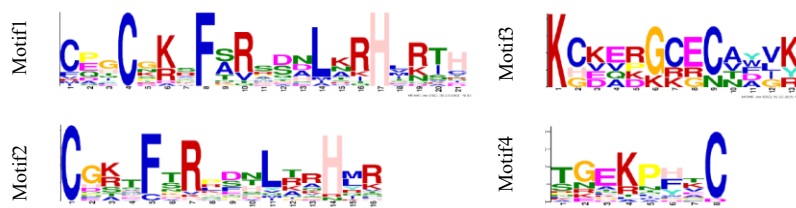


图 3 灵芝 C_2H_2 基因家族主要保守基序

Fig. 3 Main conservative motifs of C_2H_2 gene family in *G. lucidum*

至少需要 2 个串联的 ZF 域^[23], 因此猜测 Motif 1 和 Motif 2 共同组成了与 DNA 结合的串联 ZF 域, 发挥其转录因子的功能。

3.3 GIC_2H_2 家族系统发育及顺式作用元件

通过对灵芝和酿酒酵母的家族成员的系统进化研究, 利用 iqtree 软件采用最大似然法(maximum likelihood, ML) 构建系统进化树(图 4), 根据系统发育树展示的进化关系, 可将灵芝的 C_2H_2 基因家族成员分成 5 组, 命名为 Group I~V 分别含有 1、6、4、5、4 个灵芝 C_2H_2 家族成员。灵芝与酿酒酵母 C_2H_2 家族成员系统发育表明, 二者的 C_2H_2 转录因子可能在某些生物学功能上有着相似的作用, 此外, Group IV 中灵芝与酿酒酵母的 C_2H_2 家族存在明显的聚类现象, 同源关系较远, 表明不同物种的基因在进化的过程中具有一定的保守性, 有相同或相似的遗传模式^[24]。 $GIC_2H_2.09$ 是 Group I 中唯一的家族成员, 说明其起源独立于其他基因。Group IV 中的 $GIC_2H_2.03$ 、 $GIC_2H_2.10$ 、 $GIC_2H_2.13$ 、 $GIC_2H_2.15$ 聚在一支且有很高的自展值, 说明他们

可能是重复基因, 在进化过程中通过复制产生, 而其他组中 GIC_2H_2 的自展值不高, 表明其序列同源性较低。

为了探索灵芝 C_2H_2 基因潜在的生物学功能, 使用 PlantCARE 工具鉴定了基因启动子上游 2 000 bp 区域中的顺式作用元件(图 5)。 C_2H_2 基因启动子区中, 主要包含生长发育、植物激素响应和胁迫响应相关的 3 类顺式作用元件。其中最多的是光响应元件, 共 199 个, 且灵芝 C_2H_2 基因家族 20 个成员中全部含有, 分别有 154、112 个, 数目最少的为赤霉素响应元件, 只有 8 个。此外还有其他非生物胁迫响应元件, 如干旱响应、低温响应元件等。这些结果表明, C_2H_2 基因在灵芝的生长发育和应答逆境环境过程中发挥重要作用。

3.4 不同发育时期 GIC_2H_2 家族基因表达分析

通过对灵芝 6 个生长阶段的转录组数据进行聚类分析, 绘制灵芝中 C_2H_2 基因的表达模式热图(图 6)。聚类分析结果显示, 在孢子粉时期, C_2H_2 基因的表达量普遍较低甚至不表达, 在原基期、成熟期、

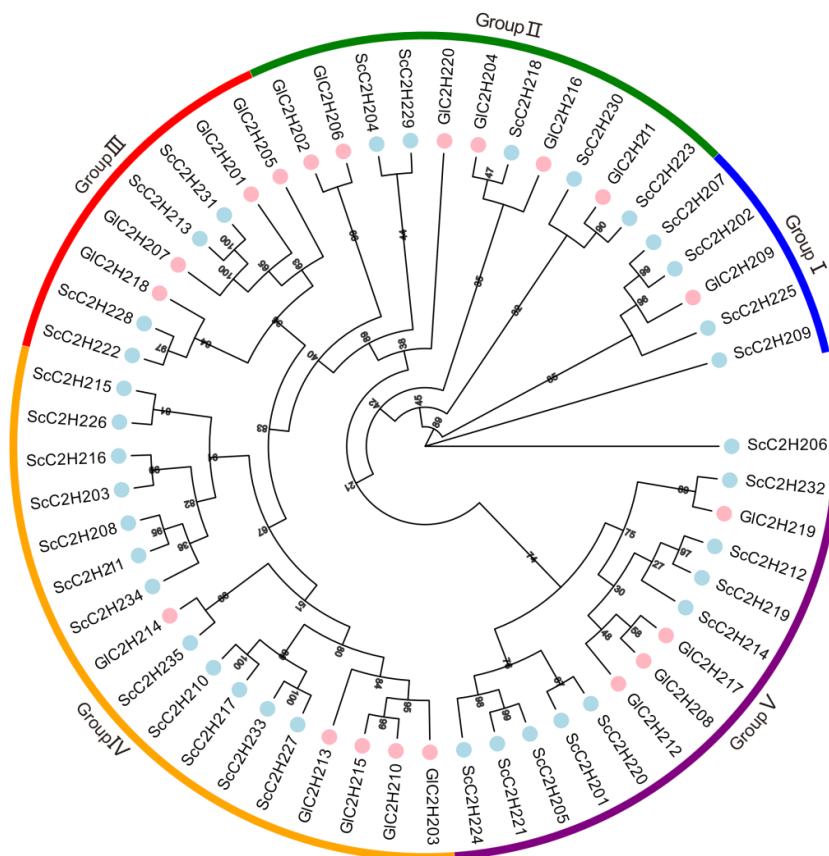


图 4 灵芝与酿酒酵母 C_2H_2 基因家族成员系统发育

Fig. 4 Phylogeny of members of C_2H_2 gene family in *G. lucidum* and *Saccharomyces cerevisiae*

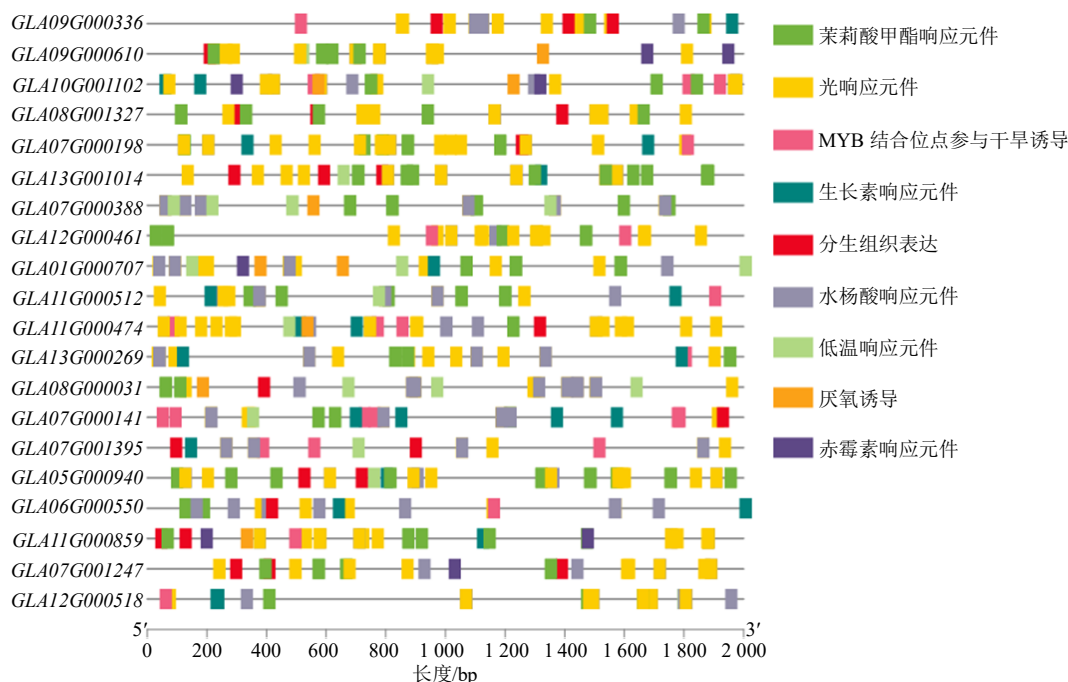


图 5 灵芝 C_2H_2 基因家族成员启动子上游顺式作用元件

Fig. 5 Upstream cis-acting element of promoter of members of C_2H_2 gene family in *G. lucidum*

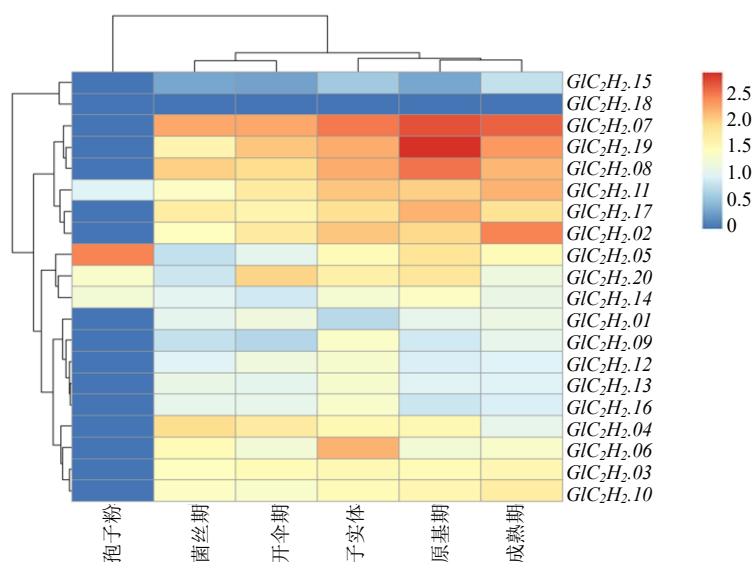


图 6 灵芝 C_2H_2 基因家族成员在不同生长时期的表达量热图

Fig. 6 Heat map of expression of members of C_2H_2 gene family in *G. lucidum* at different growth stages

子实体、菌丝体、开伞期阶段则相对较高，其中原基期表达量最高，这说明 C_2H_2 基因广泛参与灵芝菌体的形成，而在灵芝孢子粉的发育过程中参与较少。基因的聚类关系显示， $GLC_2H_2.15$ 、 $GLC_2H_2.18$ 在所有生长阶段几乎不表达，推测其可能是环境依赖型转录因子，在未受到外界胁迫的情况下表达量很低。 GLC_2H_2 家族在 6 个生长阶段的表达中， $GLC_2H_2.01$ 、

$GLC_2H_2.09$ 、 $GLC_2H_2.12$ 、 $GLC_2H_2.13$ 、 $GLC_2H_2.16$ 这 5 个基因在所有组织中表达水平都较低，表明它们可能不直接参与灵芝生长发育。 $GLC_2H_2.07$ 、 $GLC_2H_2.08$ 、 $GLC_2H_2.11$ 、 $GLC_2H_2.19$ 、 $GLC_2H_2.02$ 在原基期中高表达，当原基期逐渐分化进入开伞期，这 5 个基因的表达量有所下降，随着灵芝生长进入成熟期，其表达量又相对升高。以上结果显示， GLC_2H_2

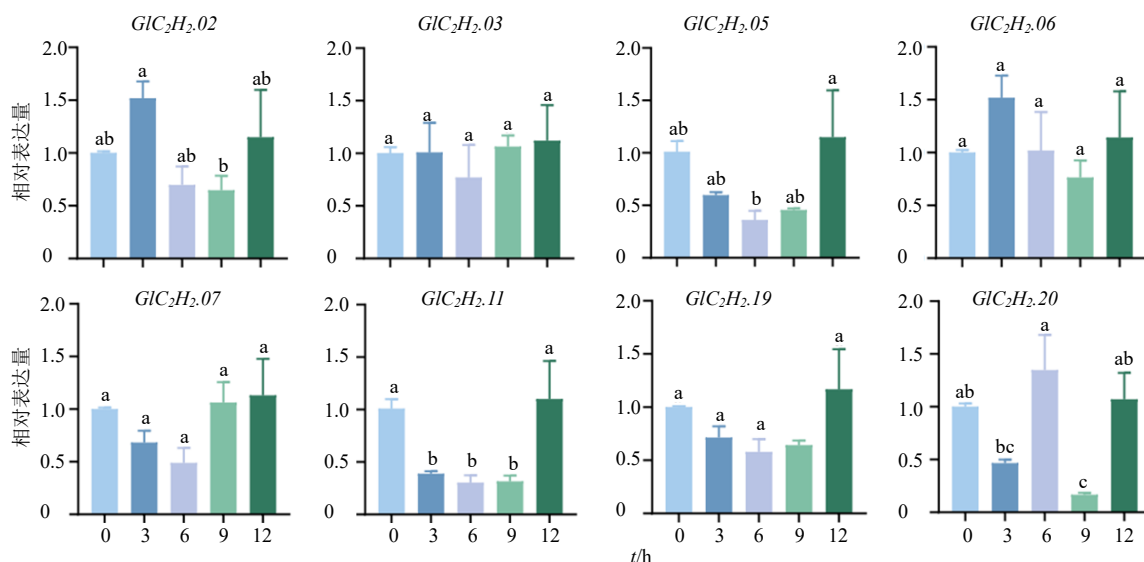
具有独特的时空表达模式,在灵芝发育过程中发挥调控功能。

3.5 茉莉酸甲酯诱导 GLC_2H_2 家族基因表达分析

为研究灵芝中 C_2H_2 是否参与 MeJA 信号响应途径,用 MeJA 处理灵芝菌丝,选择转录组数据中表达量相对较高的 8 个 C_2H_2 家族基因进行表达定量,相对表达量结果见(图 7)。其中 $GLC_2H_2.11$ 在 MeJA 处理后的 3、6、9 h 后,表达量均显著下降; $GLC_2H_2.20$ 在处理 9 h 后,表

达量下降最明显,与对照相比下降了 6.04 倍。

$GLC_2H_2.02$ 在处理 9 h 后,较处理 3 h 后的表达量下降了 2.35 倍, $GLC_2H_2.05$ 在处理 6 h 后表达量降至最低水平,12 h 后有明显升高的情况。以上结果显示,大多数 GLC_2H_2 的表达在 MeJA 处理后的不同时间点有不同程度的响应,总体在处理后的 3~9 h 呈下降趋势,12 h 后恢复至正常表达水平,表明 GLC_2H_2 基因对 MeJA 诱导具有不同的响应模式。



不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$); 相同小写字母表示组间无显著差异。

The different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$); the same lowercase letter indicates no significant difference between groups.

图 7 灵芝 C_2H_2 基因在 MeJA 处理后的 qRT-PCR 分析

Fig. 7 qRT-PCR analysis of *G. lucidum* C_2H_2 gene after MeJA treatment

4 讨论

灵芝作为热门研究的中药材,其生长发育和次生代谢是研究的主要方向,而转录因子在真菌菌核发育与代谢产物调控过程中发挥主要作用^[25],例如 Wu 等^[26]的研究表明, $GLPacC$ ($GL370073$) 沉默会抑制菌丝体的生长速度、子实体的发育和灵芝酸的合成;真菌特有的 $Zn2Cys6$ 转录因子,在稻瘟病菌中将其敲除后,对稻瘟病菌的生长、产孢、致病性有明显的抑制作用,可作为一种治疗稻瘟病的有效策略^[27]。 C_2H_2 型转录因子广泛存在于真核生物中,研究表明, C_2H_2 基因可能在大型真菌的生长发育、胁迫应对及次生代谢等方面发挥重要的作用。本研究基于生物信息学分析,对灵芝 C_2H_2 基因家族的染色体定位、进化关系、保守基序、顺式作用元件等进行分析并可视化。

在其他真菌物种的 C_2H_2 家族研究中,鉴定到了不同数量的家族成员,例如酿酒酵母^[28] (53 个)、黄萎病菌^[29] (98 个)、平菇^[19] (18 个) 玉米大斑病菌^[30] (27 个)、冬虫夏草菌^[20] (23 个)。本研究在灵芝基因组中,共鉴定了 20 个 GLC_2H_2 基因家族成员,与冬虫夏草菌中的 C_2H_2 基因数量相近,分布在灵芝的 10 条染色体上,有不同的理化性质。模体分析显示, Motif 1 存在于所有的家族成员中,说明 Motif 1 是该家族的蛋白核心序列,并与 Motif 2 共同构成与 DNA 结合的 ZF 域,行使其转录因子的功能,在灵芝生长发育过程中起到关键作用。在与酿酒酵母 C_2H_2 基因家族共同构建的进化树中,灵芝有些 C_2H_2 家族成员与酿酒酵母存在同源关系,可见 C_2H_2 基因存在进化上的保守性。这些结果表明, C_2H_2 转录因子在进化过程中出现了功能多样化,以适应不同物

种的不同生活环境。在玉米大斑病菌 C_2H_2 基因的研究中,发现菌丝、分生孢子、芽管、附着胞等部位在生长阶段,有一半的 C_2H_2 基因表达量上调^[28],证明其参与真菌生长发育过程的调控,在灵芝中可能也发挥相似的作用。

C_2H_2 -ZFPs 已被证明参与真菌的生长和发育的多个过程。Tian 等^[31]发现在具有 C_2H_2 转录因子功能丧失突变的大丽轮枝菌菌株中,菌丝生长的显著减缓,在灵芝菌丝生长中发挥同样的功能,本研究的转录组结果分析显示(图 6), $GIC_2H_2.07$ 、 $GIC_2H_2.08$ 、 $GIC_2H_2.11$ 、 $GIC_2H_2.19$ 、 $GIC_2H_2.02$ 在灵芝的 5 个生长时期表达显著,表明其为调控灵芝生命活动的关键转录因子,参与各种生命活动必须的代谢产物合成。在 Ohm 等^[32]的研究中, C_2H_2 转录因子会影响原基的形成, C_2H_2 在裂褶菌 *Schizophyllum commune* 中的失活导致聚集体的形成,但随后没有分化为原基,转录组结果同样显示 C_2H_2 在原基期的表达量高于其他时期,表明 C_2H_2 在原基的形成过程中有着至关重要的作用。Jiang 等^[33]研究表明 MeJA 可以调控大型真菌灵芝中的三萜类合成途径,提高灵芝酸含量,此外, MeJA 能够显著提高胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)以及 NO 含量,同时外源 MeJA 的添加会导致灵芝三萜含量、菌丝生长以及菌丝分叉的变化^[34]。在本研究中, MeJA 响应的顺式作用元件存在于所有的 GIC_2H_2 上游启动子中,因此选择用 MeJA 处理灵芝菌丝。发现 $GIC_2H_2.11$ 和 $GIC_2H_2.20$ 的表达量显著下降,在 Li 的研究中,发现 MeJA 处理葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 可以直接抑制其生长,破坏菌丝细胞功能及结构,抑制 DNA 和蛋白质的合成^[35],用 MeJA 处理可能同样会抑制灵芝菌丝生长,抑制蛋白质合成,由此推测 $GIC_2H_2.11$ 和 $GIC_2H_2.20$ 可能更多响应灵芝菌丝对外界的化学防御, MeJA 诱导灵芝产生抗逆应答,包括抗病和抗虫性,在这种情况下, C_2H_2 转录因子的表达量下降,以调节灵芝对外界逆境的响应。此外, MeJA 处理可能会导致调控网络的改变,引发复杂的信号转导网络调控,这些调控网络可能会影响 C_2H_2 转录因子的转录或翻译,从而会影响其表达量。

综上所述,在灵芝基因组中鉴定了 20 个 C_2H_2 型转录因子,用生物信息学的方法分析了它们的系统发育关系、基因结构、基序组成和其他结构元件。这些 GIC_2H_2 的表达谱表明他们在灵芝的不同生长

时期发挥不同的作用, MeJA 诱导表明有些 GIC_2H_2 可以响应 MeJA 信号,并且很可能参与灵芝次生代谢途径的调控,这些基因的功能有待进一步验证,为灵芝生长发育和次生代谢产物合成调控的研究提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Joseph S, Sabulal B, George V, et al. Antitumor and anti-inflammatory activities of polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* [J]. *Acta Pharm*, 2011, 61(3): 335-342.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 195-196.
- [3] 金凌云, 陈言枫, 洪丽玲, 等. 灵芝提取物 3 种中性三萜及麦角甾醇的定量分析 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(11): 2380-2386.
- [4] He X, Chen Y, Li Z, et al. Germplasm resources and secondary metabolism regulation in Reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*) [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(3): 376-382.
- [5] Xu Z T, Chen X P, Zhong Z F, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: Immunomodulation and potential anti-tumor activities [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(1): 15-27.
- [6] 陈慧, 杨海龙, 刘高强. 灵芝三萜的生物合成和发酵调控 [J]. *菌物学报*, 2015, 34(1): 1-9.
- [7] 林嘉龙, 李晓博, 周如月, 等. 乙烯调控灵芝酸生物合成关键基因的筛选 [J]. *菌物学报*, 2023, 42(1): 353-364.
- [8] Fei Y, Li N, Zhang D H, et al. Increased production of ganoderic acids by overexpression of homologous farnesyl diphosphate synthase and kinetic modeling of ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum* [J]. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 115.
- [9] 赵明文, 王胜利, 朱静, 等. 灵芝转录因子 SKN7 基因在调控灵芝三萜生物合成中的应用: 中国, CN107603987B [P]. 2020-06-09.
- [10] 朱静, 宋书琪, 岳思宁, 等. 灵芝转录因子 AreA 的生物学功能 [J]. *菌物学报*, 2020, 39(1): 57-65.
- [11] Bayram Ö, Braus G H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: The velvet family of regulatory proteins [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36(1): 1-24.
- [12] 井建玲, 张鹏, 王振宇, 等. 木薯 C_2H_2 型锌指蛋白转录因子家族全基因组鉴定及表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2020, 56(12): 2664-2676.
- [13] Han G L, Lu C X, Guo J R, et al. C_2H_2 zinc finger proteins: Master regulators of abiotic stress responses in plants [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 115.

- [14] Berg J M, Shi Y. The galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc [J]. *Science*, 1996, 271(5252): 1081-1085.
- [15] Huang J, Wang J F, Zhang H S. Rice *ZFP15* gene encoding for a novel C₂H₂-type zinc finger protein lacking DLN box, is regulated by spike development but not by abiotic stresses [J]. *Mol Biol Rep*, 2005, 32(3): 177-183.
- [16] 程秋如, 刘子凡, 曾宪海. 油棕 C₂H₂ 基因家族鉴定及低温胁迫下的表达分析 [J]. *热带作物学报*, 2023, 44(3): 453-467.
- [17] Liu L, Lyu X M, Pan Z Q, *et al.* The C₂H₂ transcription factor SsZFH1 regulates the size, number, and development of apothecia in *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Phytopathology*, 2022, 112(7): 1476-1485.
- [18] 张兴媛, 王地广, 高菁, 等. 胶孢炭疽菌 C₂H₂ 型转录因子 CgGcp1 的生物学功能 [J]. *微生物学通报*, 2022, 49(7): 2587-2598.
- [19] Ding Q Q, Zhao H Y, Zhu P L, *et al.* Genome-wide identification and expression analyses of C₂H₂ zinc finger transcription factors in *Pleurotus ostreatus* [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e12654.
- [20] 吴端, 李文佳, 姚辉, 等. 冬虫夏草菌 C₂H₂ 基因家族鉴定及其在砷胁迫下表达分析 [J]. *菌物研究*, 2020, 18(2): 110-120.
- [21] Chen S L, Xu J, Liu C, *et al.* Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 913.
- [22] Chen C J, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [23] 刘美琦, 孙伟, 孟祥霄, 等. 药用植物大麻 C₂H₂ 基因家族鉴定与表达分析 [J]. *药学学报*, 2021, 56(5): 1486-1496.
- [24] 李嘉. DUF1313 基因家族和 C₂H₂ 锌指基因家族的进化分析及其与玉米农艺性状的关联 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
- [25] 陈绮艺, 李晓, 杜文珍, 等. 转录因子 PaPho 与丝状真菌 *Podospira anserina* 中磷元素的吸收和利用研究 [J]. *微生物学报*, 2023, 63(3): 1072-1087.
- [26] Wu F L, Zhang G, Ren A, *et al.* The pH-responsive transcription factor PacC regulates mycelial growth, fruiting body development, and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum* [J]. *Mycologia*, 2016, 108(6): 1104-1113.
- [27] 曹慧娟. 稻瘟病菌 Zn₂Cys₆ 和 bHLH 家族转录因子功能分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [28] Böhm S, Frishman D, Mewes H W. Variations of the C₂H₂ zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(12): 2464-2469.
- [29] Xiong D G, Wang Y L, Deng C L, *et al.* Phylogenetic analysis revealed an expanded C₂H₂-homeobox subfamily and expression profiles of C₂H₂ zinc finger gene family in *Verticillium dahliae* [J]. *Gene*, 2015, 562(2): 169-179.
- [30] 李学然. 玉米大斑病菌 C₂H₂ 型锌指蛋白家族生物信息学分析及其基因表达研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2019.
- [31] Tian L Y, Yu J, Wang Y L, *et al.* The C₂H₂ transcription factor VdMsn2 controls hyphal growth, microsclerotia formation, and virulence of *Verticillium dahliae* [J]. *Fungal Biol*, 2017, 121(12): 1001-1010.
- [32] Ohm R A, de Jong J F, de Bekker C, *et al.* Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation [J]. *Mol Microbiol*, 2011, 81(6): 1433-1445.
- [33] Jiang A L, Liu Y N, Liu R, *et al.* Integrated proteomics and metabolomics analysis provides insights into ganoderic acid biosynthesis in response to methyl jasmonate in *Ganoderma lucidum* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6116.
- [34] 巩丽. 外源茉莉酸甲酯通过 ROS 影响灵芝菌丝生长、次级代谢和 NO 信号途径的机理研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [35] 黎晓茜. 茉莉酸甲酯对 *Botryosphaeria dothidea* 的抑菌作用及其代谢酶活性的影响 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.

[责任编辑 时圣明]