

糙皮侧耳蛋白质 N-糖基化修饰对高温胁迫的响应及其功能

麦非凡¹, 费亚昕¹, 马琳静², 李优贤¹, 戚元成¹, 胡延如¹, 刘晴¹, 文晴¹, 王风芹¹

(1 河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450046; 2 河南省南阳市科学院生物研究所, 南阳, 473000)

摘要: 【目的】探究糙皮侧耳蛋白质 N-糖基化修饰对高温胁迫的响应, 揭示其在糙皮侧耳抵抗高温胁迫中的功能。【方法】分析高温胁迫 (42 °C) 下糙皮侧耳菌丝总蛋白和甘露糖蛋白质量分数、糖供体和蛋白质 N-糖基化中间代谢物质量分数及蛋白质 N-糖基化修饰通路关键基因表达情况; 研究糙皮侧耳菌丝在衣霉素(蛋白质 N-糖基化修饰抑制剂)处理后总蛋白和甘露糖蛋白质量分数变化情况, 并以潮霉素(多肽链合成抑制剂)处理为对照, 比较衣霉素和潮霉素处理后的糙皮侧耳菌丝经高温胁迫 24 h 后的恢复生长情况。【结果】随着高温胁迫时间延长, 糙皮侧耳菌丝全细胞总蛋白质量分数逐渐升高, 全细胞甘露糖蛋白、细胞壁总蛋白和甘露糖蛋白质量分数逐渐降低。经高温胁迫 24 h 后, 糖供体 GDP-甘露糖和 UDP-N-乙酰葡萄糖胺及长萆醇二磷酸质量分数分别为对照的 36.9 倍、5.2 倍和 3.5 倍, 蛋白质 N-糖基化修饰中间代谢物长萆醇磷酸和 β -1,4-D-甘露糖基壳二糖基多萆醇质量分数分别为对照的 0.23 倍和 0.06 倍, 蛋白质 N-糖基化修饰关键基因 *alg1*、*alg7*、*alg13* 和 *alg14* 的表达量分别为对照的 0.13 倍、0.59 倍、0.28 倍和 0.07 倍。衣霉素处理显著降低了糙皮侧耳全细胞甘露糖蛋白质量分数、细胞壁总蛋白和甘露糖蛋白质量分数。经衣霉素处理的糙皮侧耳菌丝在高温胁迫后, 其恢复生长速率显著高于对照, 这与潮霉素处理相反。【结论】糙皮侧耳通过降低蛋白质 N-糖基化修饰水平提高其对高温胁迫的抗性。

关键词: 糙皮侧耳; 高温胁迫; 甘露糖蛋白; 蛋白质 N-糖基化修饰; 衣霉素

中图分类号: S646.1+41

文献标志码: A

文章编号:

Response and functional role of protein N-glycosylation

modifications in *Pleurotus ostreatus* under high-temperature stress

收稿日期: 2025-01-03 接受日期:

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-20); 河南省农业良种联合攻关项目 (2022030101)

作者简介: 麦非凡 (2000—), 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要从事食用菌栽培与生理生化研究, E-mail: 2205047806@qq.com。

通信作者: 马琳静 (1976—), 女, 河南南阳人, 助理研究员, E-mail: 526472794@qq.com; 王风芹 (1976—), 女, 河南林州人, 教授, 博士, E-mail: w_fengqin@163.com。

MAI Feifan¹, FEI Yaxin¹, MA Linjing², LI Youxian¹, QI Yuancheng¹, HU Yanru¹, LIU Qing¹,
WEN Qing¹, WANG Fengqin¹

(¹College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China; ² Institute
of Biological Research, Nanyang Science Academy of Henan Province, Nanyang 473000,
China)

Abstract: 【Objective】 Investigating the response of protein glycosylation modifications in *Pleurotus ostreatus* to high-temperature stress and elucidating its functional role in thermotolerance, thereby providing a scientific basis for understanding the molecular mechanisms of heat stress adaptation in *P. ostreatus*. 【Method】 We determined the total protein and mannose-glycosylated protein content in whole cells and cell walls of *P. ostreatus* under high-temperature stress (42 °C), along with the levels of sugar donors for protein glycosylation and intermediate metabolites of protein N-glycosylation. Additionally, we analyzed the expression of key genes involved in protein N-glycosylation pathway. To elucidate the role of reduced protein glycosylation in heat stress resistance, we compared the recovery of mycelial growth after sequential treatment with hygromycin (a polypeptide synthesis inhibitor) or tunicamycin (an N-glycosylation inhibitor) followed by 24 h of high-temperature stress. 【Result】 Under prolonged exposure to high-temperature stress (42 °C), *P. ostreatus* mycelium exhibited a progressive increase in total protein content, while showing steady declines in whole-cell mannose-glycosylated proteins, total cell wall proteins, and cell wall-associated mannose-glycosylated proteins. Following 24 h of thermal stress, the intracellular concentrations of glycosylation sugar donors GDP-mannose and GDP-N-acetylglucosamine, and dolichyl diphosphate increased significantly to 36.9, 5.2, 3.5-fold of control levels, respectively. Conversely, key N-glycosylation pathway intermediates dolichyl-phosphate and β -1,4-D-mannosylchitobiosyldiphospho-dolichol decreased markedly to just 0.23 and 0.06-fold of control values. Concurrently, the expression of critical N-glycosylation-related genes (*alg1*, *alg7*, *alg13*, and *alg14*) was downregulated to 0.13、0.59、0.28 和 0.07-fold of baseline levels. Notably, contrary to hygromycin treatment, tunicamycin-treated mycelia demonstrated enhanced recovery growth post heat stress compared to untreated controls. These findings strongly suggest that attenuation of protein glycosylation modifications contributes to enhance the resistance of *P. ostreatus* to high temperature stress. 【Conclusion】 *Pleurotus ostreatus* enhances its resistance to

high-temperature stress by reducing N-glycosylation levels of proteins.

Key words: *Pleurotus ostreatus*; high temperature stress; mannose-glycosylated protein; protein N-glycosylation; tunicamycin

糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)俗称平菇,是中国主栽食用菌之一,具有栽培方式简单、原料来源广泛、栽培周期短、产量高等优点。糙皮侧耳在中国各省均有栽培,产量仅次于香菇和黑木耳,位居第三,在中国乡村振兴和产业转型升级中发挥了重要作用^[1-4]。目前,糙皮侧耳仍然以塑料大棚栽培为主,设施简陋,环境调控能力差。温度是影响糙皮侧耳生长的重要环境因素。在实际栽培中,当环境温度超过 35 °C 并持续 48 h 时,糙皮侧耳菌丝生长停滞,细胞壁结构被破坏,该现象被称为“高温烧菌”^[5-6]。“高温烧菌”会影响糙皮侧耳的生长和发育,加重霉菌浸染,使糙皮侧耳产量和品质下降,甚至绝产绝收,造成严重的经济损失^[7-9]。

相关研究表明,高温胁迫会引起糙皮侧耳菌丝细胞壁结构发生变化。QIU 等^[10]研究发现,高温胁迫引起糙皮侧耳细胞壁几丁质质量分数显著升高、甘露糖质量分数显著下降、孔隙度增大,对细胞壁干扰剂的敏感性增加,抵御溶壁酶降解的能力显著降低。JANIK 等^[11]报道白假丝酵母(*Candida albicans*)催化蛋白质 N-糖基化修饰通路 DolPP 脱磷酸的 *Cwh8p* 缺失突变后会引引起蛋白质 N-糖基化修饰缺陷,突变株细胞壁几丁质质量分数较野生菌株提高 40%,但甘露糖质量分数大幅降低,这一现象与糙皮侧耳受高温胁迫后细胞壁组成成分变化趋势一致。真菌的细胞壁主要由以葡聚糖和几丁质为主的内层和以甘露糖蛋白为主的外层共同组成^[12],因此推测糙皮侧耳细胞壁甘露糖质量分数下降是由高温胁迫下蛋白质糖基化修饰水平下降引起。相关研究认为,蛋白质糖基化修饰水平下降会降低生物体对高温胁迫的抗性。如蛋白质 O-甘露糖转移酶(PMT)负责分泌蛋白的 O-糖基化修饰, α -1,6-甘露糖基转移酶 OCH1 是蛋白质 N-糖基化修饰过程中位于高尔基体上负责对蛋白质核心糖链进一步修饰的酶,白假丝酵母部分 PMT 蛋白和 OCH1 蛋白缺失突变后同样会导致细胞壁几丁质质量分数的升高和甘露糖蛋白质量分数的降低^[13-14]。这些突变体对温度的敏感性增强,部分菌株在 42 °C 胁迫下已不能生长。现有研究多关注高温胁迫对糙皮侧耳造成的产量变化,但针对高温胁迫造成糙皮侧耳蛋白质糖基化修饰水平改变的规律、影响机制及其功能尚不明确。

衣霉素是真核生物蛋白质 N-糖基化修饰通路第一步长萜醇磷酸的结构类似物,能够竞争性结合 UDP-N-乙酰葡萄糖胺转移酶(ALG7),阻断 N-糖基化修饰的第一步反应—多

核苷焦磷酸寡糖 (LLO) 的合成, 常被用于蛋白质 N-糖基化修饰相关研究^[15]。本研究通过分析 42 °C (以下简称高温胁迫) 菌丝全细胞和细胞壁甘露糖蛋白质量分数、蛋白质 N-糖基化修饰相关代谢物质量分数和关键基因表达情况, 探究糙皮侧耳蛋白质糖基化修饰对高温胁迫的响应情况; 通过衣霉素处理降低蛋白质糖基化修饰水平, 考察其对糙皮侧耳抗高温胁迫的影响, 以期阐明糙皮侧耳抵抗高温胁迫的分子机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 新 831 由河南农业大学食药菌研究室保藏并提供。

1.2 培养基与试剂

GYE 固体培养基 (1 L): 酵母膏 5 g, 无水葡萄糖 20 g, 七水硫酸镁 0.5 g, 磷酸二氢钾 1 g, 琼脂粉 20 g, 115 °C 灭菌 30 min。

PDA 固体培养基 (1 L): 将 200 g 马铃薯 (切成小块) 煮熟后过 8 层滤布取其滤液, 加入 20 g 无水葡萄糖溶解, 用去离子水定容, 琼脂粉 20 g, 115 °C 灭菌 30 min。

蛋白提取液 (10 mL): 0.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 6.8) 2.5 mL, 10% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) (ddH₂O 100 mL, 十二烷基硫酸钠 10 g) 2 mL, 甘油 2 mL, 1 mol·L⁻¹ 二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 1 mL; 100 mmol·L⁻¹ 苯甲磺酰氟 (Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride, PMSF) 10 μL; ddH₂O 2.5 mL; 蛋白酶抑制剂 100 μL, 磷酸酶抑制剂 100 μL。

主要试剂: 衣霉素购于上海瀚思化工有限公司; 潮霉素购于德国罗氏诊断有限公司; 酵母膏购自 OXOID; 无水葡萄糖、磷酸二氢钾、七水硫酸镁购于国药集团化学试剂有限公司; 琼脂粉购于北京兰杰柯科技有限公司; 二甲基亚砜、Tris-HCl、十二烷基硫酸钠购于北京索莱宝科技有限公司; 苯甲磺酰氟购于上海生工生物工程股份有限公司; 二硫苏糖醇购于上海源叶生物科技有限公司。

1.3 主要仪器设备

SW-CJ-1FD 单人单面净化工作台购于苏州净化设备有限公司; BCD-243 冰箱购于河南新飞电器公司; LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌锅购于上海申安医药器械厂; FXB303-1 型电热恒温培养箱购于上海树立仪器仪表有限公司; BSA124S-CW 分析天平购于赛多利斯集团; 实时荧光定量分析仪购于赛默飞世尔科技公司; 移液枪 (1、20、100 和 1 000 μL) 购于北京大龙兴创实验仪器股份公司; 医用低温保存箱购于青岛海尔生物医疗股份有限公司。

1.4 高温胁迫处理糙皮侧耳菌丝总蛋白和甘露糖蛋白质量分数测定

1.4.1 高温胁迫糙皮侧耳菌丝样品制备 参照王风芹等^[3]的研究方法, 并进行改进。将糙皮侧耳新 831 菌丝块(直径 6 mm, 以下同)接种于 GYE 固体培养基平板(直径 90 mm, 以下同)中心并于 25 °C 黑暗活化培养 7 d。取 1 块活化后的菌丝块接种于 GYE 固体培养基平板中心, 25 °C 黑暗培养 5 d 后置于 42 °C 恒温培养箱, 分别高温胁迫处理 2、4、6、12、24 h, 以 0 h 为对照。刮取热胁迫处理菌丝, 液氮冷冻干燥后置于-80 °C 保存。

1.4.2 糙皮侧耳菌丝细胞壁提取 称取上述菌丝样品 1.5 g 提取其细胞壁, 细胞壁提取参照张亚洲等^[16]的研究方法进行。

1.4.3 甘露糖蛋白和总蛋白质量分数测定 取研磨后的菌丝样品或者菌丝细胞壁样品 0.1 g 于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 去离子水, 充分震荡后 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液测定甘露糖蛋白质量分数。甘露糖蛋白质量分数测定按照甘露糖蛋白酶联免疫分析试剂盒(购自上海舒话生物科技有限公司)说明书进行^[17]。将 1.4.1 收集的菌丝样品研磨。取研磨后的菌丝样品及 1.4.2 提取的菌丝细胞壁白色沉淀于 1.5 mL 的离心管中, 分别加入 600 μL 的蛋白提取液(样品大于 0.3 g 时加入 900 μL , 不足 0.3 g 时加入 600 μL), 置于振荡器上充分混匀后沸水浴 10 min, 置于冰上冷却后 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 °C 离心 10 min; 取上清分装, 每管 50 μL , 4 °C 保存备用。总蛋白质量分数测定采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(购自上海碧云天生物科技公司)说明书进行。标准曲线: $y=0.966\,2x+0.109\,2$ 。

1.5 糙皮侧耳菌丝蛋白质 N-糖基化修饰相关代谢物质量分数分析

糙皮侧耳菌丝蛋白质 N-糖基化修饰相关代谢物的质量分数分析借助已有非靶向代谢组学分析结果进行, 包括糖供体(GDP-甘露糖、UDP-N-乙酰葡萄糖胺)、糖基载体(多萜醇二磷酸)、通路中间代谢物(多萜醇磷酸、 β -1, 4-D-甘露糖基壳二糖基多萜醇)^[18]。代谢组学数据存储在 EMBL-EBI 元光数据库(DOI: 10.1093/nar/gkz1019, PMID: 31691833)中, 标志符为 MTBLS3836。

1.6 糙皮侧耳蛋白质 N-糖基化修饰关键基因相对表达量分析

糙皮侧耳菌丝样品制备同 1.4.1。在蛋白质 N-糖基化修饰过程中, 核心糖链由多萜醇运载, 称为脂连接寡糖(lipid-linked oligosaccharide, LLO), 其合成是核心步骤, 由一系列保守的酶催化完成。本研究选取了参与 LLO 合成的关键基因, 包括多萜醇焦磷酸壳二糖- β -甘露糖基转移酶基因(*alg1*)、UDP-N-乙酰葡萄糖胺转移酶基因(*alg7*)、共同催化 N-乙酰葡萄糖胺向 LLO 转移的基因(*alg13* 和 *alg14*)及多萜醇焦磷酸磷酸酶基因(*dolpp1*), 分析其在高温胁迫下的表达模式。RNA 提取步骤参照史红鸽等^[19]的研究方法。对提取的 RNA 按照反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)说明书进行反转录, 得到 cDNA。采

用 β 肌动蛋白 (β -actin) 为内参基因^[20], 以反转录的 cDNA 为模板, 在 Quanstudio 7 Flex 上进行 RT-qPCR。每个样品进行 3 次生物学重复, 3 次技术重复。反应体系: 2*ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10.0 μ L; 上游引物 0.4 μ L; 下游引物 0.4 μ L; cDNA 1 μ L (1:5 稀释后); 补 ddH₂O 至 20.0 μ L 体系。反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; 循环反应: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 溶解曲线: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。试验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。本试验所用引物如表 1 所示, 由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers for RT-qPCR

基因名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>alg1</i>	ATGGAGGTGTGCTTGCTTC	AAGAGGGTGGTTCGGAAA
<i>alg7</i>	GGCAACAACACCGAAATAG	GGAAGAATGACATCGCCT
<i>alg13</i>	CAGACCTCATCGTTAGCCA	TGTCCCTCCTTAGCACATCT
<i>alg14</i>	GTCTTCACGGCTTTGTTTCA	AGTTTCCCAGAGAGCGACA
<i>dolpp1</i>	TCACTCTCAGTCCCATCCTC	CGCCCACATCACGATTAT

1.7 蛋白质 N-糖基化修饰在糙皮侧耳抵抗高温胁迫中的功能分析

1.7.1 衣霉素处理下糙皮侧耳菌丝总蛋白和甘露糖蛋白质量分数测定 称取衣霉素 5 mg, 加入 2.5 mL 二甲基亚砜 (dimethyl Sulfoxide, DMSO) 中, 完全溶解后得到 2 g·L⁻¹ 的衣霉素溶液, 4 $^{\circ}$ C 保存^[21]。将上述得到的衣霉素溶液按照不同体积加入经高温灭菌并冷却至 45 $^{\circ}$ C 左右的 GYE 固体培养基中, 倒平板后得到含 0、1、2、3、4 mg·L⁻¹ 衣霉素的 GYE 固体培养基平板。将 1 块活化后的糙皮侧耳新 831 菌丝块接种于含不同衣霉素浓度的 GYE 固体培养基平板中心, 25 $^{\circ}$ C 黑暗培养。待菌丝长满整个培养皿后刮取菌丝, 液氮冷冻干燥后置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。菌丝细胞壁提取方法同 1.4.2, 菌丝和细胞壁总蛋白质量分数和全细胞蛋白质量分数测定同 1.4.3。

1.7.2 高温胁迫下糙皮侧耳菌丝不同处理恢复生长情况对比

将活化后的糙皮侧耳 X831 接种于含不同衣霉素质量浓度的 GYE 固体培养基上, 25 $^{\circ}$ C 黑暗培养。待菌丝长至培养皿的 2/3 后分别将其放置于 25 或 42 $^{\circ}$ C 培养/高温胁迫 24 h, 然后用打孔器取边缘菌丝块接种至不含衣霉素的正常 GYE 固体培养基中心, 25 $^{\circ}$ C 黑暗培养, 利用十字画线法每隔 24 h 对菌落半径进行测定, 根据菌落半径随恢复生长时间的变化考察

糙皮侧耳菌丝恢复生长情况^[22]。采用潮霉素（多肽链合成抑制剂）作为对照组^[23]，具体操作同上。

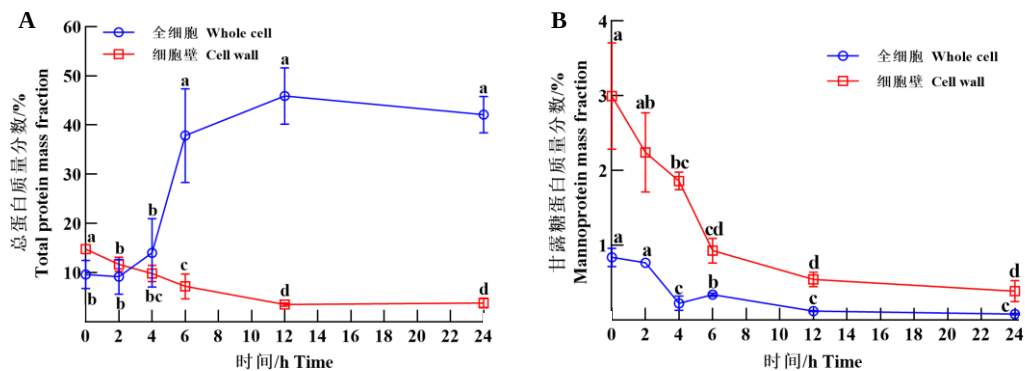
1.8 数据处理与分析

使用软件 GraphPad Prism 9 对分析后的数据绘制折线图，以均数±标准差表示；采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析，采用单因素方差分析进行多组样本均数间的比较，LSD-*t* 检验用于两两比较，*p*<0.05 表示在统计学意义上差异显著。

2 结果与分析

2.1 糙皮侧耳菌丝总蛋白和甘露糖蛋白对高温胁迫的响应

如图 1 所示，对照组（0 h）糙皮侧耳菌丝细胞壁总蛋白质量分数为 14.79%，是全细胞总蛋白质量分数 9.63% 的 1.54 倍；细胞壁甘露糖蛋白质量分数为 2.99%，是全细胞甘露糖蛋白质量分数 0.84% 的 3.56 倍。以上结果表明细胞壁上总蛋白和甘露糖蛋白质量分数均显著高于全细胞。高温胁迫 24 h 后，糙皮侧耳菌丝全细胞总蛋白质量分数显著提高至 42.12%，为对照组（0 h）的 4.37 倍；细胞壁总蛋白质量分数显著降低至 3.84%，为对照组（0 h）的 0.26 倍；全细胞甘露糖蛋白质量分数显著降低至 0.08%，为对照组（0 h）的 0.09 倍；细胞壁甘露糖蛋白质量分数显著降低至 0.39%，为对照组（0 h）0.13 倍。



不同小写字母表示在统计学意义上差异显著 (*p*<0.05)。下同。

Different lowercase letters indicate significant differences in statistical significance (*p*<0.05). The same as below.

图 1 高温胁迫下糙皮侧耳菌丝总蛋白和甘露糖蛋白质量分数的变化

Fig.1 Total protein and mannoprotein content in mycelium of *P. ostreatus* under heat stress

2.2 糙皮侧耳菌丝蛋白质 N-糖基化修饰相关代谢物对高温胁迫的响应

如表 2 所示，经高温胁迫 24 h 后，GDP-甘露糖和 UDP-N-乙酰葡萄糖胺质量分数分别为对照组（0 h）的 36.9 倍和 5.2 倍，多萜醇二磷酸的质量分数为对照组（0 h）的 3.5 倍，多萜醇磷酸和 β -1,4-D-甘露糖基壳二糖基多萜醇的质量分数仅为对照组（0 h）的 0.23 倍和 0.06 倍。高温胁迫后会使糙皮侧耳菌丝蛋白质 N-糖基化修饰所需要的糖供体和糖基载体质量分数升高，而蛋白质 N-糖基化修饰通路中间代谢物质量分数下降，表明高温胁迫影响了糙皮侧耳蛋白质 N-糖基化修饰的正常进行。

表 2 高温胁迫 24 h 糙皮侧耳菌丝蛋白质 N-糖基化修饰相关代谢物的变化

Table 2 Changes in protein N-glycosylation modification related metabolite levels in *P. ostreatus* mycelia after 24 h high-temperature stress

代谢物 Metabolites	功能 Function	上调倍数 Up-regulated times
GDP-甘露糖 GDP-Mannose	糖供体 Glycosyl donor	36.9
UDP-N-乙酰葡萄糖胺 UDP-GlcNAc		5.2
多萜醇二磷酸 Dolichyl diphosphate	糖基载体 Glycosyl carrier	3.5
多萜醇磷酸 Dolichyl-phosphate	通路中间代谢物 Intermediate metabolites	0.23
β -1, 4-D-甘露糖基壳二糖基多萜醇		0.06
β -1, 4-D-mannosylchitobiosyldiphosphodolichol		

2.3 糙皮侧耳菌丝蛋白质 N-糖基化修饰关键基因表达量对高温胁迫的响应

糙皮侧耳菌丝蛋白质 N-糖基化修饰关键基因在高温胁迫下的表达如图 2 所示。结果表明，与对照组相比，随着高温胁迫时间的延长，*alg1*、*alg7*、*alg13* 和 *alg14* 基因的相对表达水平整体呈下降趋势，在高温胁迫 24 h 时分别为对照组（0 h）的 0.13 倍、0.59 倍、0.28 倍和 0.07 倍；而 *dolpp1* 基因的相对表达水平整体呈显著上升趋势，在高温胁迫 24 h 时为对照组（0 h）的 2.07 倍。

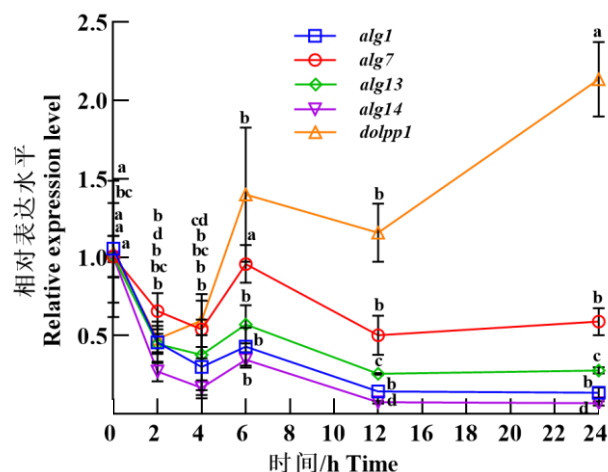


图 2 高温胁迫下糙皮侧耳菌丝蛋白质 N-糖基化修饰关键基因相对表达水平的变化

Fig.2 Relative expressions of key genes related to protein N-glycosylation of *P. ostreatus* under high temperature stress

2.4 蛋白质 N-糖基化修饰在糙皮侧耳抵抗高温胁迫中的功能

2.4.1 衣霉素处理对糙皮侧耳菌丝甘露糖蛋白质量分数的影响 随着蛋白质 N-糖基化修饰特异性抑制剂衣霉素质量浓度的升高，糙皮侧耳菌丝全细胞总蛋白质量分数变化不明显，而全细胞甘露糖蛋白质量分数、细胞壁总蛋白质量分数和细胞壁甘露糖蛋白质量分数逐渐降低。如图 3 所示，当添加 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 衣霉素时，糙皮侧耳菌丝全细胞和细胞壁总蛋白的质量分数分别为对照组（未添加衣霉素）的 0.93 倍和 0.07 倍，全细胞甘露糖蛋白和细胞壁甘露糖蛋白的质量分数分别为对照组的 0.27 倍和 0.28 倍。

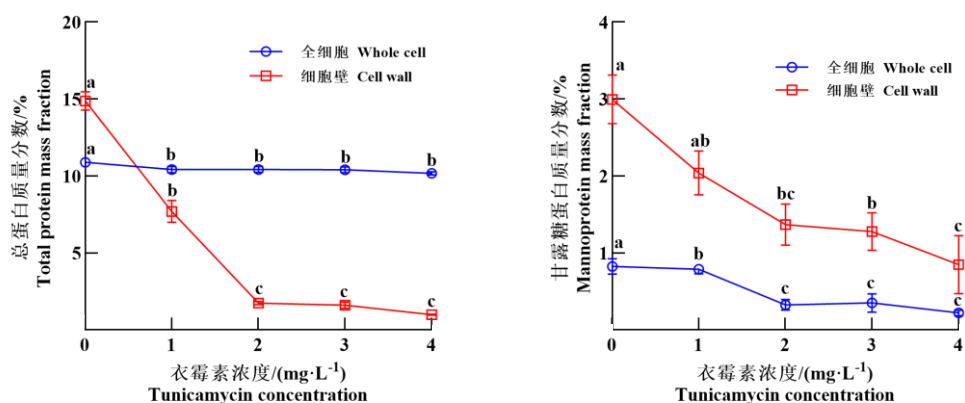


图 3 衣霉素处理下糙皮侧耳菌丝总蛋白和甘露糖蛋白质量分数的变化

Fig.3 Total protein and mannoprotein content in mycelium of *P. ostreatus* treated with different concentration of tunicamycin

2.4.2 衣霉素和潮霉素处理对高温胁迫糙皮侧耳菌丝恢复生长的影响 如图 4 所示，随着衣霉素质量浓度的升高，糙皮侧耳菌丝生长越慢。如图 5 所示，经衣霉素处理且未经高温胁迫的糙皮侧耳菌丝恢复生长情况与衣霉素质量浓度呈负相关，然而，3~4 mg·L⁻¹ 衣霉素处理的糙皮侧耳在高温胁迫 24 h 后，菌丝恢复生长情况显著优于对照组（未添加衣霉素）。如图 6 所示，无论是否经历高温胁迫，经潮霉素（多肽链合成抑制剂）处理的糙皮侧耳菌丝恢复生长情况均与潮霉素质量浓度呈负相关。衣霉素作为蛋白质 N-糖基化修饰抑制剂能够抑制糙皮侧耳菌丝生长，但经衣霉素处理糙皮侧耳菌丝在高温胁迫后恢复生长情况反而较好，同时潮霉素处理并没有同样的效果，这表明降低蛋白质 N-糖基化修饰水平可增强糙皮侧耳对高温胁迫的抗性。

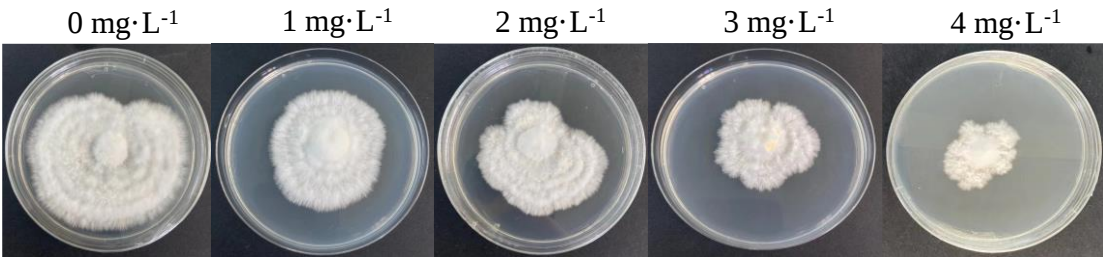
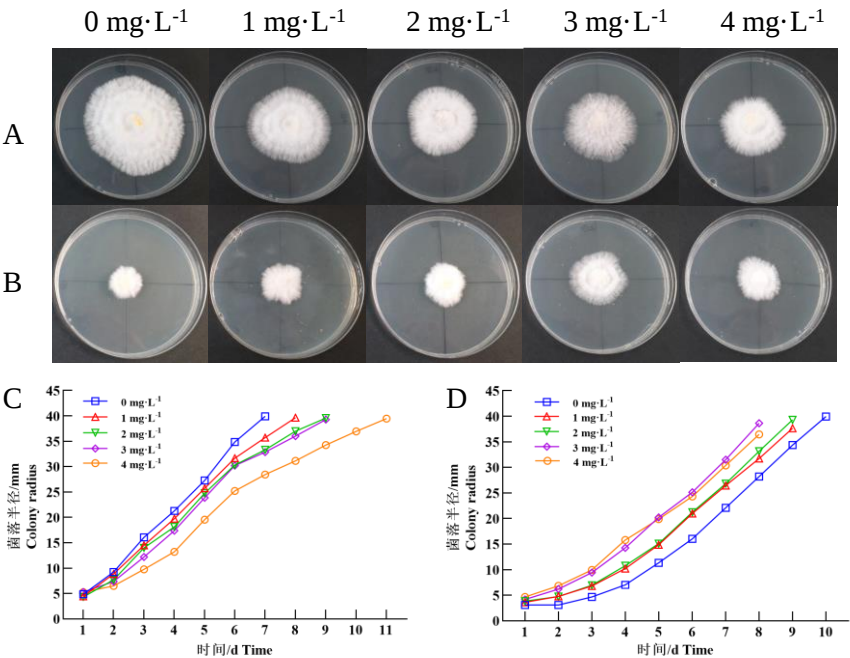


图 4 衣霉素处理下糙皮侧耳菌丝菌丝生长情况

Fig.4 Hyphae growth status of *P. ostreatus* cultured with tunicamycin

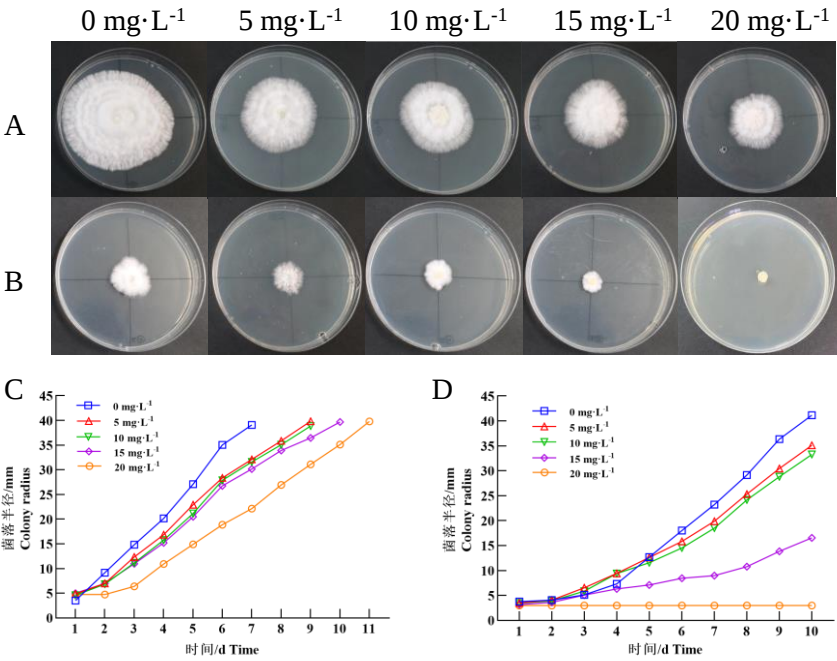


A: 25 °C培养 24 h 后恢复生长 10 d 的菌落；B: 42 °C高温胁迫 24 h 后恢复生长 10 d 的菌落；C: 25 °C 培养 24 h 后菌落半径随恢复生长时间的变化；D: 42 °C高温胁迫 24 h 后菌落半径随恢复生长时间的变化。

A: Colonies recovery growth for 10 d after 24 h of cultivation at 25 °C; B: Colonies recovery growth for 10 d after 24 h of high temperature stress at 42 °C; C: Changes in colony radius with recovery growth time after 24 h of cultivation at 25 °C;D: Changes in colony radius with recovery growth time after 24 h of high temperature stress at 42 °C.

图 5 高温胁迫下衣霉素处理糙皮侧耳菌丝恢复生长情况

Fig.5 The effect of different concentrations of tunicamycin treatment on the heat stress resistance of *P. ostreatus* hyphae



A: 25 °C培养 24 h 后恢复生长 10 d 的菌落; B: 42 °C高温胁迫 24 h 后恢复生长 10 d 的菌落; C: 25 °C 培养 24 h 后菌落半径随恢复生长时间的变化; D: 42 °C高温胁迫 24 h 后菌落半径随恢复生长时间的变化。

A: Colonies recovery growth for 10 d after 24 h of cultivation at 25 °C; B: Colonies recovery growth for 10 d after 24 h of high temperature stress at 42 °C; C: Changes in colony radius with recovery growth time after 24 h of cultivation at 25 °C; D: Changes in colony radius with recovery growth time after 24 h of high temperature stress at 42 °C.

图 6 高温胁迫下潮霉素处理糙皮侧耳菌丝恢复生长情况

Fig.6 The effect of different concentrations of hygromycin treatment on the heat stress resistance of *P. ostreatus* hyphae

3 结论与讨论

高温胁迫是食用菌产业尤其是糙皮侧耳栽培过程中经常面临的环境胁迫之一。本研究结果表明, 高温胁迫下糙皮侧耳主动下调 N-蛋白质糖基化修饰通路关键基因的表达, 降低了全细胞尤其是细胞壁甘露糖蛋白的质量分数, 但提高了糙皮侧耳对高温胁迫的抵抗能力。

42 °C可快速诱导典型的细胞壁损伤表型, 同时避免直接致死效应, 因此可设置为高温胁迫的温度, 便于抗性机制分析。本研究发现, 在经历 42 °C高温胁迫时, 糙皮侧耳菌丝蛋白质 N-糖基化修饰关键基因 *alg1*、*alg7*、*alg13*、*alg14* 等表达量显著下调, 蛋白质 N-糖

基化修饰通路受阻, 该通路中间代谢物长萆醇磷酸和 β -1, 4-D-甘露糖基壳二糖基多贴醇显著降低, 表明糙皮侧耳在经受高温胁迫时下调蛋白质 N-糖基化修饰相关通路以应对高温胁迫。蛋白质糖基化修饰会影响蛋白质的正确折叠、定位和活性, 对蛋白质功能的发挥起重要作用^[24]。蛋白质糖基化修饰缺陷使得糖蛋白不能正确定位于细胞壁上^[24], 引起细胞壁总蛋白和糖蛋白质量分数的下降。

衣霉素是蛋白质 N-糖基化修饰通路的专一性抑制剂, 生物体经衣霉素处理后可以降低蛋白质糖基化修饰水平^[15]。本研究发现, 衣霉素处理降低糙皮侧耳菌丝全细胞和细胞壁甘露糖蛋白的质量分数, 但是可以提高其对 42 °C 高温胁迫的抗性。一是因为蛋白质糖基化受阻后使得更多的 UDP-N-乙酰葡萄糖胺用于合成细胞壁几丁质, 重塑细胞壁, 提高其对高温胁迫的抵抗能力。已有研究证实, 在酿酒酵母和白色念珠菌中, 蛋白质 N-糖基化修饰缺陷会触发细胞壁完整性 (CWI) 通路, 通过上调几丁质合成酶基因表达、下调几丁质水解酶基因表达, 补偿细胞壁结构缺陷^[11]。二是因为高温胁迫后 *dolpp1* 基因表达上调, 其编码的多萆醇焦磷酸酶可将多萆醇焦磷酸水解为单磷酸, 后者可能参与膜脂代谢或几丁质前体供应, 间接支持细胞壁重塑。三是因为多余的糖供体可以用于细胞多糖的合成^[5], 从而提高细胞抗高温胁迫的能力。四是因为蛋白质糖基化修饰抑制可能减少内质网中错误折叠蛋白的积累, 从而缓解高温引发的内质网胁迫, 避免过度激活未折叠蛋白反应导致的细胞凋亡^[24]。此外, 本研究结果与白假丝酵母蛋白质糖基化修饰水平降低的突变体温度敏感性升高的研究报道^[15,24]不一致, 其原因可能在于二者考察的指标不同, 本研究重点考察的是糖基化水平降低是否影响生物体对高温胁迫的抗性, 即高温胁迫解除后生物体是否仍具有生长能力。本研究结果表明, 糙皮侧耳通过降低 N-蛋白质糖基化修饰水平来提高其对高温胁迫的抗性, 有助于阐明糙皮侧耳抵抗高温胁迫的分子机制, 从而为降低“高温烧菌”对糙皮侧耳的危害及耐高温胁迫糙皮侧耳种质资源开发提供科学依据。

参考文献 References:

[1] 张鹏涛, 竹玮, 胡延如, 等. 尿素和麦麸对糙皮侧耳生长发育和子实体营养组成的影响[J]. 河南农业大学学报, 2023, 57(6): 1044-1052.

ZHANG P T, ZHU W, HU Y R, et al. Effects of urea and wheat bran on the growth, development and fruiting body nutrient composition of *Pleurotus ostreatus*[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2023, 57(6): 1044-1052.

[2] MELANOURI E M, DIAMANTIS I, DEDOUSI M, et al. *Pleurotus ostreatus*: Nutritional enhancement and

antioxidant activity improvement through cultivation on spent mushroom substrate and roots of leafy vegetables[J]. *Fermentation*, 2025, 11(1): 20.

[3] 王风芹, 于振, 麦非凡, 等. 糙皮侧耳热激转录因子鉴定及其基因表达模式分析[J/OL]. 菌物研究, 1-13(2024-06-04). [https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx](https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFD&filename=YJJW20240602002)

WANG F Q, YU Z, MAI F F, et al. Identification of heat shock transcription factor and expression pattern of its genes in *Pleurotus ostreatus*[J/OL]. *Journal of Fungal Research*: 1-13(2024-06-04).

[https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx](https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFD&filename=YJJW20240602002) dbcode=CJFD&dbname=CJFD&filename=YJJW20240602002.

[4] 杨军. 基于钻石模型的食用菌产业扶贫潜力分析与思考[J]. 中国农业资源与区划, 2019, 40(4): 34-39.

YANG J. Analysis on the potential of edible fungi industry for poverty alleviation based on diamond model[J]. *Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional Planning*, 2019, 40(4): 34-39.

[5] 胡延如, 丁佳雪, 董浩哲, 等. 热胁迫对糙皮侧耳抗霉菌侵染能力的影响[J]. 菌物学报, 2022, 41(7): 1080-1087.

HU Y R, DING J X, DONG H Z, et al. Effects of heat stress on resistance of *Pleurotus ostreatus* to mould infection[J]. *Mycosystema*, 2022, 41(7): 1080-1087.

[6] 决超. 高温胁迫对平菇生理生化特征影响研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011.

JUE C. Studies on physiological characteristics effects of *Pleurotus ostreatus* under high temperature stress[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2011.

[7] 仇志恒. 糙皮侧耳栽培中高温引发木霉侵染的生理机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.

QIU Z H. The study on physiological mechanism of *Trichoderma*-infection caused by high temperature stress in *Pleurotus ostreatus* cultivation[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.

[8] 闫志宇. 糙皮侧耳高温胁迫下的核心碳代谢响应[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.

YAN Z Y. Core carbon metabolism response of *Pleurotus ostreatus* to high temperature stress[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.

[9] 张美敬, 刘秀明, 邹亚杰, 等. 侧耳属食用菌高温胁迫条件优化研究[J]. 菌物学报, 2015, 34(4): 662-669.

ZHANG M J, LIU X M, ZOU Y J, et al. Optimization of heat stress for *Pleurotus* spp. cultivation[J]. *Mycosystema*, 2015, 34(4): 662-669.

[10] QIU Z H, WU X L, GAO W, et al. High temperature induced disruption of the cell wall integrity and structure in *Pleurotus ostreatus* mycelia[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(15): 6627-6636.

[11] JANIK A, NIEWIADOMSKA M, PERLIŃSKA-LENART U, et al. Inhibition of dephosphorylation of

dolichyl diphosphate alters the synthesis of dolichol and hinders protein N-glycosylation and morphological transitions in *Candida albicans*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(20): 5067.

[12] 朱信霖, 扈东营, 陈显振, 等. 作用于细胞壁的抗真菌药物研究进展[J]. 菌物学报, 2022, 41(6): 871-877.

ZHU X L, HU D Y, CHEN X Z, et al. A review of the study on antifungal drugs acting on cell wall[J]. Mycosystema, 2022, 41(6): 871-877.

[13] PRILL S K H, KLINKERT B, TIMPEL C, et al. PMT family of *Candida albicans*: Five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(2): 546-560.

[14] BATES S, HUGHES H B, MUNRO C A, et al. Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(1): 90-98.

[15] XIAO H P, SMEEKENS J M, WU R H. Quantification of tunicamycin-induced protein expression and N-glycosylation changes in yeast[J]. Analyst, 2016, 141(12): 3737-3745.

[16] 张亚洲. 水杨酸影响小麦与禾谷镰刀菌互作机制[D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.

ZHANG Y Z. Molecular mechanisms on the role of salicylic acid in the interaction between wheat and *Fusarium graminearum*[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2020.

[17] 方圆. 烤烟叶片发育及细胞壁糖蛋白(Expansin)积累规律的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.

FANG Y. The research of cured tobacco leaf development and regularity for accumulate of cytoderm expansins[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2009.

[18] HU Y R, WANG Y, CHEN Y J, et al. Salicylic acid enhances heat stress resistance of *Pleurotus ostreatus* (jacq.) P. kumm through metabolic rearrangement[J]. Antioxidants, 2022, 11(5): 968.

[19] 史红鸽, 戚元成, 申进文. 一种从平菇菌丝中提取总 RNA 的方法[J]. 江西农业学报, 2014, 26(8): 68-70.

SHI H G, QI Y C, SHEN J W. A method for extraction of total RNA from *Mycelium* of *Pleurotus ostreatus*[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2014, 26(8): 68-70.

[20] 胡延如, 邵玉强, 陈浩澜, 等. 糙皮侧耳热胁迫背景下 RT-qPCR 内参基因的筛选[J]. 菌物研究, 2023, 21(增刊 1): 200-206.

HU Y R, SHAO Y Q, CHEN H L, et al. The screening of reference genes in RT-qPCR under heat stress of *Pleurotus ostreatus*[J]. Journal of Fungal Research, 2023, 21(Suppl 1): 200-206.

[21] 黄盛世. 蛋白质糖基化抑制剂衣霉素与紫杉醇联合用药的抗肿瘤作用研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.

HUANG S S. Studies on the antitumor effect of protein glycosylation inhibitor tunicamycin in combination with

paclitaxel[D]. Jinan: Shandong University, 2017.

[22] 缪静, 孙磊, 李维焕, 等. 茶树菇菌种固体培养基及培养条件的优化[J]. 食用菌, 2017, 39(3): 35-37.

MIAO J, SUN L, LI W H, et al. [Optimization of solid culture medium and culture conditions of *Agrocybe aegerita* strain](#)[J]. Edible Fungi, 2017, 39(3): 35-37.

[23] 王冰. 不同浓度潮霉素对盐芥根生长的影响[J]. 现代农业科技, 2012(3): 233, 236.

WANG B. [Effects of different concentrations of hygromycin on the growth of salt mustard roots](#)[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2012(3): 233, 236.

[24] HERNÁNDEZ-ELVIRA M, TORRES-QUIROZ F, ESCAMILLA-AYALA A, et al. The unfolded protein response pathway in the yeast *Kluyveromyces lactis*. a comparative view among yeast species[J]. Cells, 2018, 7(8): 106.