

刘明, 刘海峰, 周慧, 何焕清, 肖自添, 罗学梅. 草菇多酚氧化酶基因的克隆与表达分析 [J]. 广东农业科学, 2021, 48(9): 91-97.

草菇多酚氧化酶基因的克隆与表达分析

刘明¹, 刘海峰², 周慧¹, 何焕清¹, 肖自添¹, 罗学梅³

(1. 广东省农业科学院蔬菜研究所 / 广东省草菇科技创新中心 / 广东省蔬菜新技术研究重点实验室, 广东 广州 510640; 2. 广东省现代农业装备研究所, 广东 广州 510630; 3. 广东省农业技术推广中心, 广东 广州 510520)

摘要:【目的】解析草菇多酚氧化酶基因家族序列信息, 明确其特征和表达模式。【方法】通过转录组测序找出含有酪氨酸酶结构域的基因, 并根据搜索得到的序列设计引物, 以不同发育时期的草菇 v26 菌株, 以及草菇蛋形期外菌膜、菌盖、菌柄等不同组织为材料提取 RNA, 经反转录为 cDNA, 扩增获得草菇多酚氧化酶基因序列。采用在线生物信息学网站预测草菇多酚氧化酶的理化性质。采用 RT-PCR 的方法, 检测草菇不同发育时期和不同组织部位多酚氧化酶的表达模式。【结果】获得 4 个草菇多酚氧化酶基因家族的 CDS 序列, 依次命名为 *VvPPO1*、*VvPPO2*、*VvPPO3*、*VvPPO4*, 其中 *VvPPO1* CDS 全长 1 596 bp、编码 531 个氨基酸, *VvPPO2* CDS 全长 2 685 bp、编码 894 个氨基酸, *VvPPO3* CDS 全长 1 593 bp、编码 530 个氨基酸, *VvPPO4* CDS 全长 2 067 bp、编码 688 个氨基酸。生物信息学分析表明, 4 个基因编码的蛋白均含有 2 个铜离子结合区, 为亲水性蛋白; RT-PCR 结果显示, 4 个基因在草菇发育的菌丝期、原基期、蛋形期、成熟期均有表达, *VvPPO1*、*VvPPO3* 和 *VvPPO4* 的表达量在子实体时期高于菌丝期, 在蛋形期 *VvPPO1* 和 *VvPPO4* 在外菌膜的表达量比在菌柄和菌盖中的表达量高。【结论】在草菇中搜索得到 4 个多酚氧化酶基因, 均含有 2 个铜离子结合区, 4 个基因在各个发育时期均有表达。

关键词: 草菇; 多酚氧化酶; 褐变; 表达分析; 基因编码

中图分类号: S646.1+3

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X(2021)09-0091-07

Cloning and Expression Analysis of Polyphenol Oxidase Gene Family in *Volvariella volvacea*

LIU Ming¹, LIU Haifeng², ZHOU Hui¹, HE Huanqing¹, XIAO Zitian¹, LUO Xuemei³

(1. Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Guangdong Straw Mushroom Technology Innovation Center / Guangdong Key Laboratory for New Technology Research of Vegetables, Guangzhou 510640, China; 2. Guangdong Institute of Modern Agriculture Equipment, Guangzhou 510630, China; 3. Guangdong Agricultural Technology Promotion Center, Guangzhou 510520, China)

Abstract: 【Objective】The study is presented to obtain the sequence information of polyphenol oxidase gene family in *Volvariella volvacea*, and identify their characteristics and expression patterns. 【Method】The genes containing tyrosinase domains were found out through transcriptome sequencing, and their primers were designed according to the obtained sequences. By using the tissues at different developmental stages of the v26 strain, as well as the outer membrane, cap, and stipe of the egg-shaped stage as materials, RNA was extracted and reversely transcribed into cDNA. The cDNAs were used as the template to amplify the polyphenol oxidase gene sequences. The online bioinformatics website was used

收稿日期: 2021-08-20

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2018B020206001); 广州市科技计划项目(201803020023, 201904010408); 广东省农业科学院院长基金(201840)

作者简介: 刘明(1984—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为食用菌遗传与育种, E-mail: liuming@gdaas.cn
通信作者: 罗学梅(1968—), 男, 高级农艺师, 研究方向为农业技术推广, E-mail: L117902@163.com

to predict the physicochemical properties of *V. voluacea* polyphenol oxidase. The RT-PCR method was used to detect the expression patterns of polyphenol oxidase in different developmental stages and different tissues. 【Result】 A total of four CDS sequences of PPO genes were cloned from *V. voluacea*, named as *VvPPO1*, *VvPPO2*, *VvPPO3* and *VvPPO4*. The *VvPPO1*, *VvPPO2*, *VvPPO3* and *VvPPO4* CDSs were 1 596 bp, 2 685 bp, 1 593 bp and 2 067 bp in length and encoded 531, 894, 530 and 688 amino acids, respectively. Bioinformatics analysis showed that the proteins encoded by the four genes were hydrophilic proteins. VvPPOs had typical characteristics of PPO protein, holding a tyrosinase central domain which could bind two copper ions. RT-PCR results showed that the 4 genes were expressed in the hyphae, primordium, egg-shaped and mature stages. The expression of *VvPPO1*, *VvPPO3* and *VvPPO4* in the fruiting body were higher than that in the hyphae. In the egg-shaped stage, the expression of *VvPPO1* and *VvPPO4* in the outer membrane were higher than that in the stipe and cap. 【Conclusion】 A total of four *VvPPO* genes were obtained in *V. voluacea*, all of which contained a tyrosinase central domain and two copper-binding sites, and *VvPPO* genes were expressed in all developmental stages.

Key words: *Volvariella voluacea*; polyphenol oxidase; browning; expression analysis; gene encoding

【研究意义】草菇 (*Volvariella voluacea*)，别名南华菇、兰花菇、美味草菇及中国菇等，是一种生长于热带、亚热带地区的食用菌，其人工栽培技术起源于中国^[1]。新鲜草菇肉质脆嫩，易受到机械损伤，因具有强烈的呼吸作用和代谢活动，采后 1~2 d 子实体萎缩褐变，价值显著降低，新鲜草菇长时间贮藏和远距离运输较难实现^[2]。研究发现，草菇发生褐变主要与多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO) 活性、维生素 C 及总酚含量有关。在 PPO 作用下酚类底物氧化形成黑色素的醌类物质，促使草菇快速褐变^[3]。在运输过程中受到机械损伤的影响，草菇组织破裂会导致酚类底物与 PPO 接触，从而加速褐变反应^[4]。克隆并分析草菇 PPO 基因家族对草菇抗褐变品种选育及改良有重要参考价值。【前人研究进展】PPO 是一种广泛存在于植物、动物、细菌和真菌中的含铜酶。PPO 可根据底物特异性和结构分为酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1)、儿茶酚氧化酶 (EC 1.10.3.1) 和漆酶 (EC 1.10.3.2)^[5]。在食用菌中如双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)、香菇 (*Lentinula edodes*)、滑子菇 (*Pholiota nameko*)、平菇 (*Pleurotus ostreatus*)、玉木耳 (*Auricularia cornea*) 等已鉴定多个多酚氧化酶，其中在香菇中分离到 1 个多酚氧化酶基因，表达量分析发现该基因在菌丝期到转色期表达量逐渐升高，在原基形成后表达量降低，该基因可能与香菇的转色有关^[6-7]；在对滑子菇的研究中分离到 1 个 42 ku 的多酚氧化酶，该酶以活性前体的形式表达，在蛋白酶的作用下切割 C 端序列而生成有活性的成熟酶^[8]；在平菇中分离到 1 个 75 ku 的酪氨酸酶，该酶具有较高比活力，可用于食品工业^[9]；在玉木耳中克隆到 1 个多酚氧化酶，其在菌丝期表达量较低在子实体中表达量较高^[10]。在双孢菇中已克隆鉴定出 6

个 PPO 基因^[11]，利用 CRISPR-Cas9 基因编辑系统对双孢蘑菇基因组中 1 个多酚氧化酶基因进行编辑，使得 PPO 酶活降低 30%，有效减缓了双孢蘑菇的褐变现象^[12]。

【本研究切入点】草菇基因组测序的完成对草菇基因功能的研究起到了极大的促进作用^[13]。本研究通过生物信息学分析，从草菇中筛选和克隆获得 PPO 基因家族成员，分析其家族序列特征，分析该家族在各个发育时期和组织部位的表达差异，为进一步进行遗传改良提供参考。【拟解决的关键问题】分析研究草菇中 PPO 基因家族的结构特点和表达模式，以期解析草菇褐变机理积累数据，为草菇抗褐变、耐存储品种选育等提供支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

供试草菇菌株 v26，保存于广东省农业科学院蔬菜研究所食用菌菌种保藏中心。菌丝培养采用 PDA 培养基，出菇培养基为 50% 稻草、50% 棉籽壳，含水量 65%。

1.2 试验方法

出菇试验于 2021 年 3 月在广东省农业科学院钟落潭白云试验基地进行，于菌丝期、原基期、蛋形期、成熟期 4 个不同时期取样。另外，在蛋形期对外菌膜、菌柄、菌盖 3 个不同部位进行取样，迅速用液氮冷冻，然后于 -80 ℃ 保存，备用。

1.2.1 *VvPPO* 基因家族序列获得 根据广东省蔬菜新技术重点实验室 2015 年测得的草菇菌丝转录组结果 (PRJNA408191) 和公布的草菇基因组信息 (NCBI 登录号: GCA_000349905)，筛选得到功能注释为 PPO 的 4 个基因全长序列，分别命名为 *VvPPO1* (MZ322862)、*VvPPO2* (MZ440853)、

VvPPO3 (MZ440854)、*VvPPO4* (MZ440855)。据此设计 CDS 全长引物, 设计 *VvPPO1*、*VvPPO2*、*VvPPO3* 和 *VvPPO4* 基因序列引物和 CDS 引物, 引物信息见表 1。

采用生工生物工程(上海)股份有限公司总 RNA 提取试剂盒提取草菇菌丝 RNA, 采用赛默飞有限公司生产的逆转录试剂盒合成 cDNA, 采用 CTAB 法提取草菇 DNA。以草菇菌丝 cDNA 和基因组 DNA 为模板进行扩增。PCR 扩增产物纯化后, 与 pMD18-T 载体进行连接, 阳性克隆进行测序。

1.2.2 生物信息学分析 蛋白质一级结构分析采用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线程序, 三级结构分析采用 SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive/>); 蛋白序列相似性分析运用 LALIGN (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/>); 基因结构分析运用 Simple

Modular Architecture Research Tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)。

1.2.3 进化树分析 利用 Clustal W 对草菇、双孢蘑菇、香菇、巴西蘑菇 (*Agaricus blazei*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的 PPO 氨基酸序列进行多重序列比对, 并在 MEGA7 软件中使用邻位相连法 (Neighbor-joining) 构建进化树^[14], 并进行 1 000 次抽样置换检测。

1.2.4 VvPPO 基因家族表达分析 以草菇不同发育时期和蛋形期不同组织部位的 cDNA 为模板, 以 *VvTUBa* 为内参^[15], 反应引物见表 1。采用擎科 2 × T5 Fast qPCRMix (SYBRGreen) 试剂盒, PCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s、58 °C 退火 30 s, 40 个循环; 每个反应重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达量^[16]。

表 1 供试引物信息

Table 1 Information of tested primer sequences

试验 Experiment	基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
全长扩增 Full-length amplification	<i>VvPPO1</i>	CCGCCGTGACACATTAGAAAG	GAGCGAGGGCGAGTTTGAAT
	<i>VvPPO2</i>	CGAGTTCCTTATGCGCCCTTC	GGAGAACGCAGCACTGTCAA
	<i>VvPPO3</i>	TACTGCTATCTTCGACGGGC	ACTATATGCTTTGGTTGTAT
	<i>VvPPO4</i>	TTATGCTTGGGTCTGGGCT	GCAGTTAACACACCCAATTCCA
CDS 扩增 CDS amplification	<i>VvPPO1</i>	ATGTCAGGAAAGTCTTAATCAC	CTAACGAGAGCCTCCAGAAGCAC
	<i>VvPPO2</i>	ATGGCTGGAGCGACTATTGGCTCT	TCACCCAGAAGCTGGAGTCTCTC
	<i>VvPPO3</i>	ATGTCAGGCAAGCTCTTAATTAAT	TTAAGGCGGGGGCTGGCGGAA
	<i>VvPPO4</i>	ATGTTCAAGATTGCTACTCGTTT	TCACGCAACTCTCTCACCC
实时荧光定量分析 Real-time fluorescence quantitative PCR analysis	<i>VvPPO1</i>	GAGGTGCTCAAAGACGCTCA	TAGGGCGCTGAAAACCTCTG
	<i>VvPPO2</i>	ACGACCTCGAACTCAAACC	GTCACCGTATCTTTGCCCCA
	<i>VvPPO3</i>	GAGGGAAAGGGCGAAACTGA	ACTGGGAGCGTCATAGGAGT
	<i>VvPPO4</i>	AGAGGGCTATGAGGTGGTGT	CACCACAGGAGACGACCAAA
	<i>TUBa</i>	GAGCCCAATGTTATCGATGAAGTGC	GTCTTTTGCCAAATTGCTAGTGCCC

2 结果与分析

2.1 VvPPO 基因家族的获得

测序结果表明, *VvPPO1* CDS 全长 1 596 bp (图 1 A), 含 7 个外显子和 6 个内含子; *VvPPO2* CDS 全长 2 685 bp (图 1B), 含 9 个外显子和 8 个内含子; *VvPPO3* CDS 全长 1 593 bp (图 1C), 含 7 个外显子和 6 个内含子; *VvPPO4* CDS 全长 2 067 bp (图 1D), 含 14 个外显子和 13 个内含子。

2.2 VvPPO 基因家族编码蛋白质特征分析

ProParam 分析表明, 草菇 PPO 基因家族所编码蛋白的氨基酸数目在 530~894 之间, 相对分子

量最小的是 *VvPPO1*, 最大的是 *VvPPO2*; 理论等电点 pI 范围 5.34~5.95; 蛋白的不稳定系数均大于 40, 表明草菇 PPO 蛋白为不稳定蛋白; 总平均疏水指数均为负值, 表明 4 个草菇 PPO 蛋白为亲水蛋白 (表 2)。

SMART 分析表明, 4 个草菇 PPO 蛋白的 Tyrosinase 结构域长度为 236~335 个氨基酸 (图 2)。双孢蘑菇 PPO 催化活性中心都包括 2 个保守的含铜结构域 CuA 和 CuB, 其中含高度保守的 3 个组氨酸, 蛋白序列比对显示草菇 PPO 蛋白, 酪氨酸酶 CuA 和 CuB 结合位点保守 (图 3)。Swiss-model 分析表明, 三级结构中间有 2 个铜离子结合域 (图 4)。

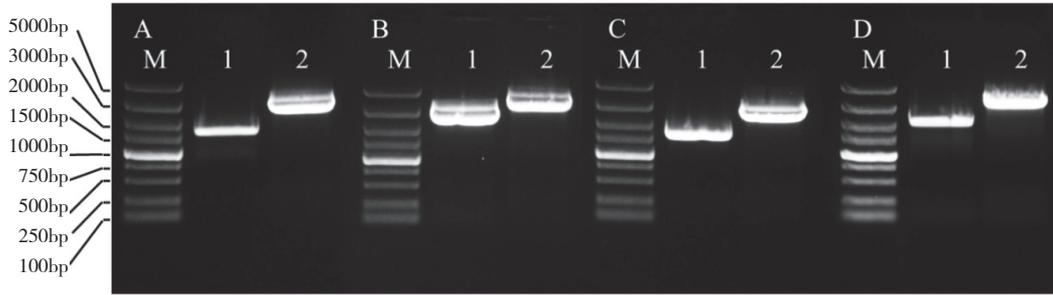


图 1 *VvPPO* 基因家族 PCR 扩增产物
 Fig. 1 Amplified product of *VvPPO* gene family by PCR
 A: *VvPPO1* 基因扩增产物, M: Marker DL5000, 泳道 1: *VvPPO1* 基因 CDS, 泳道 2: *VvPPO1* 基因全长; B: *VvPPO2* 基因扩增产物, M: Marker DL5000, 泳道 1: *VvPPO2* 基因 CDS, 泳道 2: *VvPPO2* 基因全长; C: *VvPPO3* 基因扩增产物, M: Marker DL5000, 泳道 1: *VvPPO3* 基因 CDS, 泳道 2: *VvPPO3* 基因全长; D: *VvPPO4* 基因扩增产物, M: Marker DL5000, 泳道 1: *VvPPO4* 基因 CDS, 泳道 2: *VvPPO4* 基因全长
 A: Amplified product of *VvPPO1*, M: Marker DL5000, lane1: CDS of *VvPPO1*, lane 2: Full-length of *VvPPO1*; B: Amplified product of *VvPPO2*, M: Marker DL5000, lane1: CDS of *VvPPO2*, lane 2: Full-length of *VvPPO2*; C: Amplified product of *VvPPO3*, M: Marker DL5000, lane1: CDS of *VvPPO3*, lane 2: Full-length of *VvPPO3*; D: Amplified product of *VvPPO4*, M: Marker DL5000, lane1: CDS of *VvPPO4*, lane 2: Full-length of *VvPPO4*

图 1 *VvPPO* 基因家族 PCR 扩增产物
 Fig. 1 Amplified product of *VvPPO* gene family by PCR

表 2 *VvPPO* 蛋白理化性质预测
 Table 2 Prediction of physical and chemical properties of *VvPPO* gene family

基因 Gene	分子式 Molecular formula	氨基酸残基数 Number of amino acid	分子量 Molecular weight (u)	理论等电点 Theoretical isoelectric point	脂类结合蛋白质指 Aliphatic protein index (%)	蛋白质不稳定指数 Protein instability index (%)	总平均疏水指数 Grand average of hydropathicity
<i>VvPPO1</i>	$C_{2656}H_{4040}N_{738}O_{801}S_7$	531	59350.18	5.75	72.37	49.15	-0.486
<i>VvPPO2</i>	$C_{4532}H_{6890}N_{1234}O_{1334}S_{21}$	894	100679.29	5.9	75.13	42.02	-0.488
<i>VvPPO3</i>	$C_{2708}H_{4072}N_{732}O_{785}S_{12}$	530	59827.27	5.95	73.75	46.48	-0.477
<i>VvPPO4</i>	$C_{3481}H_{5259}N_{935}O_{1034}S_{21}$	688	77423.95	5.34	74.04	46.16	-0.393

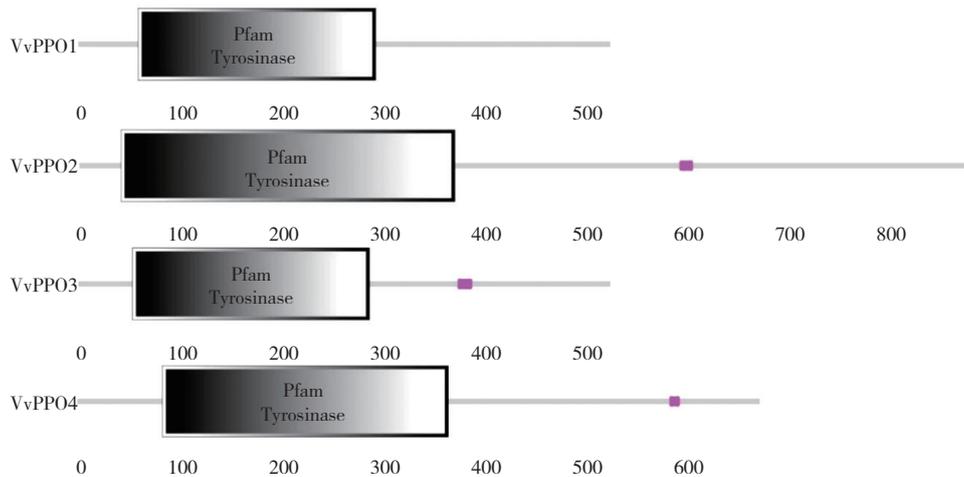


图 2 *VvPPO* 蛋白保守结构域预测
 Fig. 2 Conventional domains prediction for *VvPPO* protein

2.3 *VvPPO* 蛋白的同源比对与进化树分析

蛋白序列相似性分析显示 (表 3), *VvPPO* 蛋白序列相似度介于 48.1%~73.5%, 其中 *VvPPO1* 与 *VvPPO3* 最高相似度为 63.1%, *VvPPO2* 与 *VvPPO4* 最高相似度为 73.5%。将草菇 PPO 蛋白序列与双孢蘑菇、香菇、巴西蘑菇、烟曲霉、粗糙脉孢菌 PPO 蛋白序列进行进化树分析,

VvPPO1、*VvPPO3* 与双孢蘑菇、香菇、巴西蘑菇 PPO 聚为一类, *VvPPO4* 与烟曲霉聚为一类, *VvPPO2* 单独聚为一类 (图 5)。

2.4 *VvPPO* 基因家族表达分析

VvPPO 基因在不同发育时期的表达量分析表明, 4 个多酚氧化酶基因在草菇各个发育时期中都有表达。*VvPPO1* 在原基期表达量最高, 随

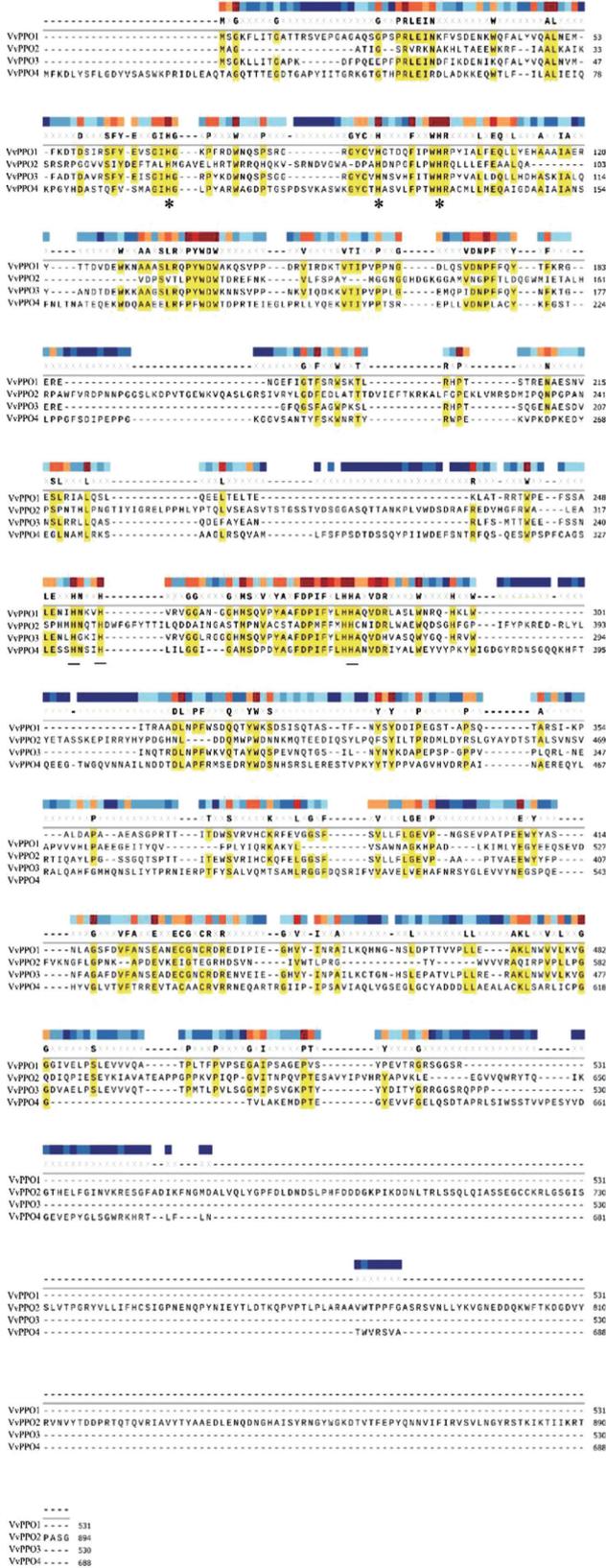


图3 VvPPO 蛋白序列比对
Fig. 3 Comparison of VvPPO protein sequence

突出显示的区域具有 60% 或更高的同源性；
* 表示 CuA 结合组氨酸，_ 表示 CuB 结合组氨酸
Highlighted areas have 60% or higher homology. * underlined histidines are of CuA. Second three underlined and bold histidines are of CuB

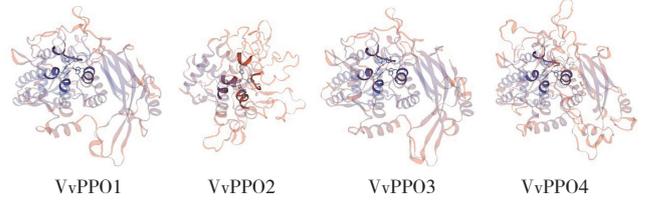


图4 VvPPO 蛋白三级结构预测
Dark area represents the copper ion binding area

图4 VvPPO 蛋白三级结构预测
Fig. 4 Three-dimensional structure prediction for VvPPO proteins

表3 VvPPO 蛋白序列相似性
Table 3 Sequence similarity of VvPPO Proteins

蛋白 Protein	相似度 Similarity (%)		
	VvPPO2	VvPPO3	VvPPO4
VvPPO1	48.1	63.1	55.7
VvPPO2		52.9	73.5
VvPPO3			52.8

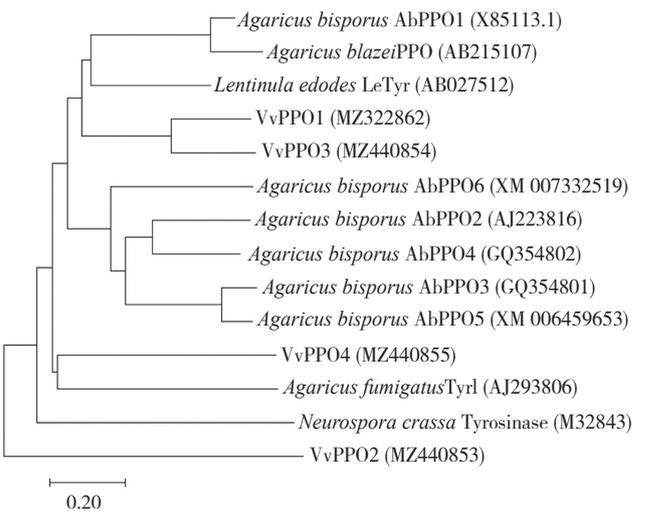


图5 VvPPO 蛋白进化树分析
Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of VvPPO proteins

着发育的成熟表达量逐渐降低；VvPPO2 在菌丝期表达量最高；VvPPO3 在原基期表达量最高，其在各个时期的表达模式和 VvPPO1 较为相似；VvPPO4 在菌丝期表达量最低，蛋形期表达量最高（图 6 A）。VvPPO 基因在蛋形期不同组织部位的表达量分析表明，VvPPO1、VvPPO4 在外菌膜中表达量较高，在菌盖和菌柄中表达量较低，其中 VvPPO1 在外菌膜的表达量要比在菌盖和菌柄中的表达量高 10 倍以上；VvPPO2、VvPPO3 在菌柄中的表达量较高，在外菌膜和菌盖中表达量较低（图 6 B）。

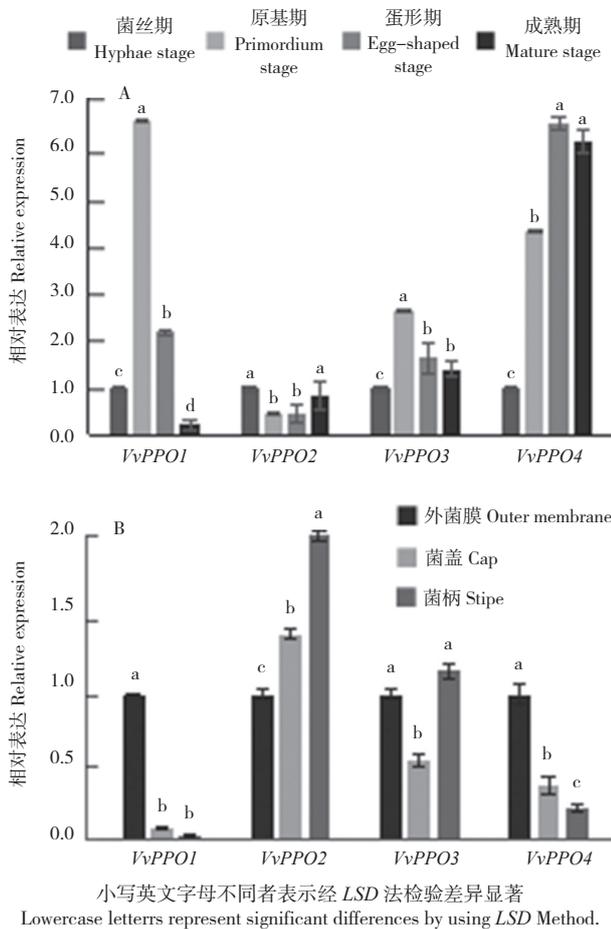


图6 *VvPPO* 基因在不同发育时期和蛋形期组织部位表达情况

Fig. 6 Expression of *VvPPO* genes in different developmental stages and tissue parts

3 讨论

研究发现 PPO 与果蔬发生褐变有关^[17], 在大花金鸡菊 (*Coreopsis grandiflora*) 的研究中发现多酚氧化酶 AUS1 与 aurone 的合成有关^[18], 说明 PPO 功能的多样性。草菇 PPO 家族蛋白序列相似性分析显示, 草菇 VvPPO1 与 VvPPO3 相似度较高, 在不同发育时期的表达模式也较相似; 三级结构预测显示 VvPPO2 与另外 3 个草菇 PPO 蛋白结构差异明显; 草菇 PPO 蛋白序列与双孢蘑菇、香菇、巴西蘑菇、烟曲霉、粗糙脉孢菌 PPO 序列进化分析结果显示, VvPPO2 单独聚为一类, 说明 VvPPO2 与另外 3 个 PPO 生物功能不同。

不同的 PPO 基因表达模式不同, 在植物不同发育时期表达量差异明显, 且 PPO 的表达还受到生物和非生物胁迫的影响^[19]。双孢蘑菇的发育过程中, 子实体时期 PPO 的活性增强, 菌盖表面褐变程度与 PPO 活性呈正相关关系^[6]。对

VvPPO 基因的表达分析结果显示, 除 *VvPPO2* 外, 其他草菇 PPO 基因在菌丝期表达量较低, 原基形成后表达量迅速升高, 到成熟期时表达量渐渐降低, 在蛋形期的不同组织部位表达量检测结果显示, 在蛋形期 PPO 在各个组织部位均有表达。*VvPPO1* 和 *VvPPO4* 在外菌膜中的表达量最高, 可能是蛋形期引起草菇褐变的关键基因。*VvPPO2* 在外菌膜中表达量最低, 在菌柄中表达量最高, *VvPPO2* 在各个组织部位的表达量差异不明显, 这意味着草菇 PPO 功能的差异。

在果蔬抗褐变的研究中以 PPO 基因为靶标进行基因编辑已经获得了抗褐变的苹果 (*Malus sieversii*)、茄子 (*Solanum melongena*) 和马铃薯 (*Solanum tuberosum*)^[20-22] 等, 如在马铃薯中通过编辑多酚氧化酶基因 *StPPO2* 获得了多酚氧化酶活性降低 63%、酶促褐变降低 73% 的植株。在双孢蘑菇中通过编辑 PPO 基因获得了抗褐变双孢蘑菇^[12], 本研究初步分析了草菇 PPO 基因家族的特征和表达模式, 为进一步揭示草菇褐变的发生机理、培育抗褐变草菇提供理论依据。

4 结论

本研究基于草菇基因组数据, 挖掘获得 4 个多酚氧化酶基因, 蛋白序列分析显示 4 个草菇 PPO 蛋白中菌含有保守 Tyrosinase 结构域, 具有 PPO 蛋白典型特征, 含有铜离子 A (CuA) 和 B (CuB) 结合区。同源比对与进化分析显示 VvPPO1 与 VvPPO3 相似性较高, VvPPO4 与烟曲霉同源性较高, VvPPO2 单独聚为一类, 表明它们可能具有不同功能。草菇 PPO 基因表达模式分析显示 *VvPPO1*、*VvPPO3* 与 *VvPPO4* 子实体时期表达量比菌丝期表达量高, *VvPPO2* 在各个发育时期表达量变化不明显。在蛋形期外菌膜中 *VvPPO1* 和 *VvPPO4* 表达量较高, *VvPPO1* 和 *VvPPO4* 可能与蛋形期草菇褐变有关。

参考文献 (References):

- 何焕清, 肖自添, 彭洋洋, 刘明, 徐江. 草菇栽培技术发展历程与创新研究进展[J]. 广东农业科学, 2020, 47(12):53-61. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2020.12.006.
- HE H Q, XIAO Z T, PENG Y Y, LIU M, XU J. Development history and innovation research progress of straw mushroom cultivation technology [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, 47(12):53-61. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874x.2020.12.006.
- 李瑞容, 林俊芳, 郑倩望, 邹苑, 郭丽琼. 草菇采后生物学特性变化及保鲜技术研究进展[J]. 中国蔬菜, 2021(6):27-33.

- DOI:10.19928/j.cnki.1000-6346.2021.2017.
- LI R R, LIN J F, ZHENG Q W, ZOU Y, GUO L Q. Changes in biological characteristics of postharvest mushroom (*Volvariella volvacea*) and research progress in quality preservation technology [J]. *China Vegetables*, 2021, 6(6):27-33. DOI: 10.19928/j.cnki.1000-6346.2021.2017.
- [3] CHEN B, WU G H, LI L, WEI Q, ZHONG Q G, CHEN X N, XIAO K Q, XIE B G, JIANG Y J. Effects of 1-methylcyclopropene on the quality attributes of harvested Chinese mushroom (*Volvariella volvacea*) fruiting bodies [J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(2): 747-754. DOI: 10.1002/fsn3.919.
- [4] SAKINAH N M J, MISRAN A, MAHMUD T M M, ABDULLAH S. A review: production and postharvest management of *Volvariella volvacea* [J]. *International Food Research Journal*, 2019, 26(2): 367-376.
- [5] PANADARE D, RATHOD V K. Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, 14: 431-437. DOI: 10.1016/j.beab.2018.03.010.
- [6] KANDA K, SATO T, ISHII S, EHNEI, EJIRI S. Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of *Lentinus edodes* fruiting body [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60(8): 1273-1278. DOI: 10.1271/bbb.60.1273.
- [7] VETCHINKINA E P, GORSHKOV V Y, AGEVA M V, GOGOLEV Y V, NIKITINA V E. Activity and expression of laccase, tyrosinase, glucanase, and chitinase genes during morphogenesis of *Lentinus edodes* [J]. *Microbiology*, 2015, 84(1): 49-58. DOI: 10.1134/S0026261715010166.
- [8] KAWAMURA-KONISHI Y, TSUJI M, HATANA S, ASANUMA M, KAKUTA D, KAWANO T, MUKOUYAMA E B, GOTO H, SUZUKI H. Purification, characterization, and molecular cloning of tyrosinase from *Pholiota nameko* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(7): 1752-1760. DOI: 10.1271/bbb.70171.
- [9] ZAIDI K U, ALI A S, ALI S A. Purification and characterization of high potential tyrosinase from macrofungi and its appliance in food engineering [J]. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 2021: 203-206. DOI: 10.15414/jmbfs.2015.5.3.203-206.
- [10] 苏文英, 杨和川, 谭一罗, 惠林冲, 秦裕营, 李晓. 玉木耳络氨酸酶基因的克隆及表达分析 [J]. *江西农业学报*, 2021, 33(3):88-93. DOI: 10.19386/j.cnki.jxnyxb.2021.03.14.
- SU W Y, YANG H C, TAN Y L, HUI L C, QIN Y Y, LI X. Cloning and expression analysis of tyrosinase gene from *Auricularia cornea* [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2021, 33(3):88-93. DOI: 10.19386/j.cnki.jxnyxb.2021.03.14.
- [11] WEIJN A, BASTIAAN-NET S, WICHERS H J, MES J J. Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 55:42-53. DOI: 10.1016/j.fgb.2012.10.004.
- [12] WALTZ E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation [J]. *Nature News*, 2016, 532(7599): 293. DOI: 10.1038/nature.2016.19754.
- [13] BAO D P, GONG M, ZHENG H J, CHEN M J, ZHANG L, WANG H, ZHOU Y, JIANG J P, WU L, ZHU Y Q, ZHU G, LI C H, WANG S Y, ZHAO Y, ZHAO G P, TAN Q. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(3): e58294. DOI: 10.1371/journal.pone.0058294.
- [14] KUMAR S, STECHER G, AND TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33:1870-1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054.
- [15] QIAN J, GAO Y N, WANG Y, WU Y Y, WANG Y, ZHAO Y C, CHEN H Y, BAO D P, XU J Y, BIAN X H. Selection and evaluation of appropriate reference genes for RT-qPCR normalization of *Volvariella volvacea* gene expression under different conditions [J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/6125706.
- [16] ZHAO X, SONG X X, LI Y P, YU C X, ZHAO Y, GONG M, SHEN X X, CHEN M J. Gene expression related to trehalose metabolism and its effect on *Volvariella volvacea* under low temperature stress [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1-14. DOI: 10.1038/s41598-018-29116-z.
- [17] 李彩云, 李洁, 严守雷, 王清章. 果蔬酶促褐变机理的研究进展 [J]. *食品科学*, 2021, 42(9):283-292. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20200401-008.
- LI C Y, LI J, YAN S L, WANG Q Z. Progress in research on the mechanism of enzymatic browning in fruits and vegetables [J]. *Food Science*, 2021, 42(9): 283-292. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200401-008.
- [18] KAINITZ C, MOLITOR C, THILL J, KAMPATSIKAS I, MICHAEL C, HALBWIRTH H, ROMPEL A. Cloning and functional expression in *E. coli* of a polyphenol oxidase transcript from *Coreopsis grandiflora* involved in aurone formation [J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(18): 3417-3426. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.07.034.
- [19] 王丽, 王万兴, 索海翠, 胡新喜, 秦玉芝, 李小波, 熊兴耀. 植物中多酚氧化酶基因研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(14):4629-4636. DOI: 10.13271/j.mpb.018.004629.
- WANG L, WANG W X, SUO H C, HU X X, QIN Y X, LI X B, XIANG X Y. Research progress of polyphenol oxidase gene in plants [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(14), 4629-4636. DOI: 10.13271/j.mpb.018.004629.
- [20] STOWE E, DHINGRA A. Development of the Arctic® Apple [J]. *Plant Breeding Reviews*, 2021, 44: 273-296. DOI: 10.1002/9781119717003.ch8.
- [21] MAIOLI A, GIANOGLIO S, MOGLIA A, ACQUADRO A, VALENTINO D, MILANI A M, PROHENS J, ORZAEZ D, GRANELL A, LANTERI S, COMINO C. Simultaneous CRISPR/cas9 editing of three PPO genes reduces fruit flesh browning in *Solanum melongena L* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 1883. DOI: 10.3389/fpls.2020.607161.
- [22] GONZÁLEZ M N, MASSA G A, ANDERSSON M, TURESSON H, OLSSON N, FÄLT A F, STORANI L, DÉCIMA O C A, HOFVANDER P, FEINGOLD S E. Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a polyphenol oxidase gene via ribonucleoprotein complexes delivery of the CRISPR/Cas9 system [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 10: 1649. DOI: 10.3389/fpls.2019.01649.

(责任编辑 邹移光)



刘明, 博士, 副研究员, 现任广东省农业科学院蔬菜研究所食用菌研究室主任, 广东省食用菌协会常务理事, 德国马克斯普朗克演化生物研究所访问学者。

主要从事食用菌遗传育种与高效栽培技术研究工作。主持省级科研项目3项, 获广东省科技进步奖二等奖1项、广东省农业技术推广奖一等奖1项, 发表科技论文10多篇, 获发明专利4项。作为广东省科技特派员在韶关、河源、梅州、湛江等地开展食用菌新品种与栽培技术推广工作。