

· 基础研究 ·

雪峰虫草子座不同生长发育时期的转录组研究[△]钟灿^{1,2}, 金剑¹, 刘浩¹, 谢景¹, 刘平安¹, 张水寒^{1*}

1. 湖南省中医药研究院 中药研究所, 湖南 长沙 410013;

2. 道地药材国家重点实验室, 北京 100700

[摘要] 目的: 挖掘调控雪峰虫草生长发育的相关通路和基因, 揭示其子座生长发育的内在分子机制。方法: 采用转录组测序技术(RNA-Seq)对雪峰虫草子座菌丝体(MD1)、子座原基(PD2)和子座(SD3)生长发育3个不同阶段进行测序; 数据通过非冗余蛋白(NR)、Swiss-Prot、Pfam、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、真核生物相邻类的聚簇(KOG)、基因本体(GO)数据库进行功能注释。利用EdgeR软件进行差异表达基因分析, 挖掘调控雪峰虫草子座生长发育的相关通路和基因。结果: 测序结果显示, MD1、PD2、SD3分别获得了8.15、7.51、6.87 GB分析数据, 拼接分析数据共获得34 218个转录本, 平均长度为5502 bp, 组装及去冗余后获得10 511条unigenes, 平均长度为2470 bp。KOG功能注释和GO富集分析显示, 细胞和细胞组分、新陈代谢过程、信号转导及碳代谢是雪峰虫草子座发育过程中的关键基因类别。对子座不同生长发育时期的基因进行差异表达分析发现, PD2和SD3相比差异表达基因最多, 其中上调基因1073个, 下调基因1036个, MD1和SD3相比差异表达基因最少, 上调基因533个, 下调基因578个。差异表达基因的KEGG通路富集结果显示, 细胞外信号调节激酶(MAPK)信号通路是参与调节雪峰虫草子座生长发育的关键信号通路。结论: *Ste2*和*Gpd1*及其所在途径可能分别调控雪峰虫草子座原基的形成和子座的生长。

[关键词] 雪峰虫草; 人工培育; 丝状真菌

[中图分类号] R282.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)03-0523-10

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20211025002

Transcriptomic Analysis of *Ophiocordyceps xuefengensis* Stromata at Different Development StagesZHONG Can^{1,2}, JIN Jian¹, LIU Hao¹, XIE Jing¹, LIU Ping-an¹, ZHANG Shui-han^{1*}

1. Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China;

2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective:** To study the molecular mechanism of the growth and development of *Ophiocordyceps xuefengensis* stromata. **Methods:** RNA-Seq was employed to determine the sequences and to mine the differentially expressed genes (DEGs) of the mycelium (MD1), primordium (PD2), and stroma (SD3) samples of *O. xuefengensis*. The obtained data were used for annotation against the Non-Redundant Proteins (NR), Swiss-Prot, Pfam, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), clusters of EuKaryotic Orthologous Groups (KOG), and Gene Ontology (GO) databases. The differentially expressed genes were analyzed by EdgeR software, and the related pathways and genes regulating the growth and development of *O. xuefengensis* stromata were excavated. **Results:** From MD1, PD2, and SD3 samples respectively, 8.15, 7.51, and 6.87 GB clean reads were obtained. A total of 34 218 transcripts with an average length of 5502 bp were acquired. After assembly and redundancy removal, 10 511 unigenes were obtained with an average length of 2470 bp. The KOG annotation and GO enrichment analysis showed that the key genes in the development of *O. xuefengensis* were involved in cells and cellular parts, metabolic processes, signal transduction, and carbon metabolism. There were 1073 significantly up-regulated genes and 1036 significantly down-regulated genes in SD3 as compared with PD2, as well as 533 significantly up-regulated genes and 578 significantly down-regulated genes in SD3 as compared with MD1. The KEGG pathway enrichment

[△] **[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81673585); 湖南省自然科学基金项目(2020JJ5330); 2017年中医药公共卫生服务补助专项(财社〔2017〕66号); 中央本级重大增减支项目(2060302); 湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目(湘卫函〔2019〕196号); 湖南省科技重大专项(2014FJ1007)

* **[通信作者]** 张水寒, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 药用植物资源综合开发利用; E-mail: zhangshuihan0220@126.com

showed that the DEGs were mainly involved in the MAPK signaling pathway in the growth and development of *O. xuefengensis* stromata. **Conclusion:** *Ste2* and *Gpd1* respectively regulate the formation of the primordium and stroma of *O. xuefengensis*.

[Keywords] *Ophiocordyceps xuefengensis* T. C. Wen, R. C. Zhu, J. C. Kang & K. D. Hyde; artificial cultivation; filamentous fungus

虫草是我国具有特殊意义的重要药用真菌，由于野生资源的匮乏，其人工培育备受学者关注。虫草的人工培育包括虫菌复合体、子座和发酵液等不同方式，虫草人工培养对虫草类真菌的科学研究和综合开发利用具有双重意义。

雪峰虫草 *Ophiocordyceps xuefengensis* T. C. Wen, R. C. Zhu, J. C. Kang & K. D. Hyde^[1]是2012年全国第四次中药资源普查中在湖南省雪峰山区发现的一种民间称为“仙草”的虫草类药用资源，其与冬虫夏草亲缘关系近，在洞口县民间替代冬虫夏草用于治疗癌症、咳嗽及提高免疫力等^[2]。雪峰虫草是与冬虫夏草同科属的虫草真菌，本课题组基于线粒体基因组研究发现两者亲缘关系在同科属真菌中最近。基于雪峰虫草生物学特性的认识及虫草人工培育文献的广泛调研，已开展了雪峰虫草复合体、子座和发酵菌丝体的人工培育研究^[3]。诸多学者开展了虫草子座人工培养的探索^[4-6]。基于雪峰虫草复合体人工培育的条件，本课题组对雪峰虫草人工子座培养基进行优化，成功培养了雪峰虫草子座^[7]，然而雪峰虫草子座生长发育的调控机制尚未见报道。

本研究采用Illumina高通量测序技术，对人工培育的雪峰虫草子座的3个关键阶段（菌丝体、子座原基和子座）进行转录组测序，比较分析其子座形成不同阶段的基因表达差异，研究与雪峰虫草子座生长发育相关的功能基因和代谢机制，以期挖掘雪峰虫草生长发育的调控通路、丰富虫草类真菌的发育机制，为虫草类真菌生产应用提供参考。

1 材料

1.1 菌株

雪峰虫草 *Ophiocordyceps xuefengensis* T. C. Wen, R. C. Zhu, J. C. Kang & K. D. Hyde菌种由本课题分离纯化保存，由湖南省中医药研究院中药研究所刘浩副研究员鉴定。

1.2 试药

真菌培养基1 L（含蛋白胨5 g、酵母粉4 g、葡

萄糖30 g、磷酸二氢钾1 g、七水硫酸镁0.5 g），用于菌丝体发酵；固体培养基除以上试剂外，每升培养基加琼脂20 g，用于雪峰虫草菌丝体活化；子座培养基（每瓶含米饭15 g、蚕蛹粉2 g、真菌液体培养基60 mL）。

TRIzol、RNA提取试剂盒、反转录试剂盒和DNA Marker均来自北京擎科生物技术有限公司；TBE缓冲液[粉剂，1×，即用型琼脂糖片剂，生工生物工程（上海）股份有限公司]；QuantiFluor® dsDNA System（普洛麦格公司）。

1.3 仪器

2100 Bioanalyser型生物分析仪（安捷伦公司）；ND-2000型超微量分光光度计（NanoDrop公司）；LDZX-75KBS型立式压力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）；SW-CJ-2FD型洁净工作台（苏净集团安泰空气技术有限公司）；ZQPL-200型立式全温振荡培养箱（天津莱玻特瑞仪器设备有限公司）；RXZ-280C-LED型智能人工气候箱（宁波江南仪器厂）。

2 方法

2.1 培育条件

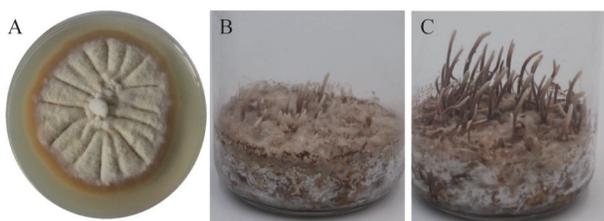
雪峰虫草菌丝体和子座的人工培育条件参照文献[8]。

2.2 RNA提取和检测

采集平板上的雪峰虫草菌丝体（MD1，图1A）及米饭培养基上的子座原基（PD2，图1B）、子座（SD3，图1C）3个不同阶段的雪峰虫草样品，采用TRIzol法提取组织中的总RNA，然后分别采用2100 Bioanalyser型生物分析仪、ND-2000型超微量分光光度计检测RNA样品的质量，以保证使用合格的样品进行转录组测序。

2.3 测序

样品总RNA经检测合格后送至上海美吉生物医药科技有限公司进行cDNA文库构建，通过QuantiFluor® dsDNA System定量，按数据比例混合



注: A. 菌丝体; B. 子座原基; C. 子座。

图1 不同生长发育阶段的雪峰虫草

上机;采用新一代的自动化测序流程进行桥式扩增,生成 clusters;在 Illumina 平台上机测序。所有数据均上传至美国国家生物技术信息中心(NCBI)序列读取存档数据库中(登录号分别为 SAMN20892925、SAMN20892926、SAMN20892927、SAMN20893057、SAMN20893058、SAMN20893059、SAMN20940921、SAMN20940922、SAMN20940923)。

2.4 数据拼接组装

将原始测序数据(raw data)进行过滤筛选,得到分析数据(clean reads)。参照文献[9]方法,将所得 clean reads 通过 Trinity 软件(<http://trinityrnaseq.sf.net>)进行从头拼接组装(de novo assembly),获得最终转录本序列,通过聚类去冗余后获得 unigenes 序列,再与公共数据库进行比对,对 unigenes 进行基因注释和功能分析。

2.5 Unigene 基因注释和功能分析

通过 BlastX 进行同源性比较(算法: $E\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$),将拼接得到的非冗余 unigenes 通过 Blast2GO 6.0 软件完成基因本体(GO)分析^[10],在 NCBI 非冗余蛋白数据库(NR, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/sprot>)、蛋白家族数据库(Pfam, <https://pfam.sanger.ac.uk/>)、真核生物相邻类的聚簇(KOG,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>)数据库中进行功能分析,通过京都基因与基因组百科全书(KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>) orthology (KO) 获得相关代谢通路^[11]。

2.6 差异表达基因(DEGs)分析

以 FPKM (fragments per kilobase per million) 值的大小衡量不同样品基因表达水平的高低^[12],并由此得出标准化的 \log_2 fold-change (\log_2FC),利用 EdgeR 差异分析软件计算 \log_2FC 及其统计检验的 P 值^[13]。当 1 个基因同时满足 $|\log_2FC| > 1$ 且 $P < 0.05$ 时,则视该基因为 DEGs。最后对 DEGs 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 代谢通路富集分析^[14]。

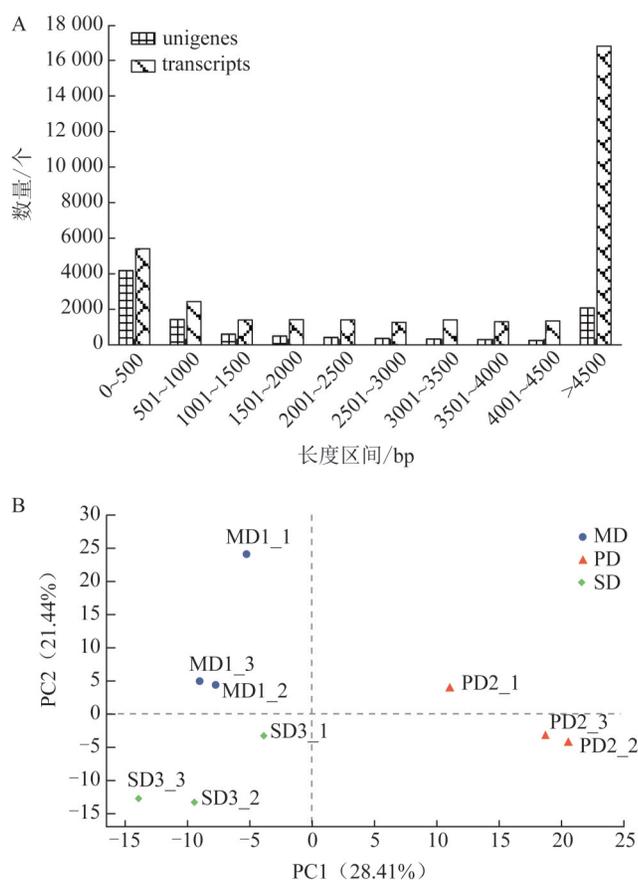
3 结果与分析

3.1 转录组数据质量分析

以 MD1、PD2 和 SD3 为样本进行 RNA-Seq 测序后获得原始数据,去除带接头 reads 和低质量的 reads,综合 3 次测序结果的平均值,分别获得了 8.15、7.51、6.87 GB 分析数据,不同样本的 Q20 (测序准确率在 99% 以上的碱基占总碱基的百分比)为 97.39%~97.72%, Q30 (测序准确率在 99.9% 以上的碱基占总碱基的百分比)为 94.03%~94.40%, G+C 占比为 60.76%~61.69%, 碱基错误率 $< 0.025\%$ (表 1)。拼接分析数据共获得 34 218 个 transcripts, 平均长度为 5502 bp, N50 和 E90 分别是 6462、6682 bp; 获得 10 511 个 unigenes, 平均长度为 2470 bp, N50 和 E90 分别为 5986、7230 bp, transcript 和 unigenes 长度分布见图 2A, 说明该测序结果可靠性较高。同时对样本进行主成分分析(PCA, 图 2B), 发现同一阶段的不同样本聚类在一起, 说明样本一致性较好, 可用于下一步分析研究。

表 1 雪峰虫草转录组测序数据质量统计

样品	原始数据/条	纯净数据/条	分析数据/GB	错误率/%	Q20/%	Q30/%	G+C 占比/%
MD1-1	68 980 144	67 685 094	9.23	0.025 3	97.56	94.21	60.76
MD1-2	59 129 504	57 778 998	7.87	0.025 3	97.50	94.25	60.91
MD1-3	55 137 888	53 932 704	7.35	0.025 6	97.39	94.03	61.36
PD2-1	56 738 528	55 880 470	7.67	0.025 2	97.64	94.32	61.59
PD2-2	52 337 484	51 469 608	7.15	0.025 1	97.70	94.36	61.69
PD2-3	56 587 456	55 684 678	7.71	0.025 1	97.72	94.40	61.76
SD3-1	51 263 070	50 402 656	6.98	0.025 1	97.69	94.33	61.34
SD3-2	51 212 620	50 363 272	6.98	0.025 2	97.66	94.31	61.53
SD3-3	48 582 066	47 713 866	6.63	0.025 4	97.58	94.10	61.20



注: A. 转录本长度注释; B. 样品PCA。

图2 雪峰虫草转录本长度注释和样品PCA

3.2 转录组 unigenes 注释结果及富集分析

将10 511条 unigenes 在6大数据库中进行基因功能注释, unigenes 全部被注释成功。其中, KOG 数据库中注释的 unigenes 个数最多, 为7039个; KEGG 中注释的 unigenes 个数最少, 为3922个(表2)。

表2 雪峰虫草转录组 unigenes 注释成功率统计

数据库	基因数/个	占比/%
GO	5416	51.53
KEGG	3922	37.31
KOG	7039	66.97
NR	6508	61.92
Swiss-Prot	5821	55.38
Pfam	5625	53.52

在GO数据库中注释成功的5416条 unigenes 按照生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)进行分类, unigenes 主要参与细胞过程、代谢过程和生物调节历程, 分布在细胞膜系统、细胞器和大分子复合物, 发挥催化活性和结合等功能

(图3A)。

将KO数据库注释成功的3922个 unigenes 根据参与的KEGG代谢通路分为6个大类, 在代谢的二级分类中, 主要分布在碳代谢、氨基酸代谢、能量代谢、脂代谢。除此之外, 还有辅因子和维生素代谢、异种生物降解和代谢、核苷酸代谢、多糖生物合成代谢、萜类化合物和多酮类化合物代谢等代谢途径, 以及环境适应、细胞生长和死亡、运输和分解代谢(图3B)。

3.3 不同时期雪峰虫草的基因差异

将3个不同时期的雪峰虫草样本的基因相互之间进行比较, 以获得不同生长发育阶段的共有和特有DEGs。从韦恩图(图4A)可以看出, MD1与SD3相比差异最小, 而3个不同生长阶段的雪峰虫草样本间的共有DEGs为139个。由图4B可以看出, PD2和SD3相比DEGs最多, 其中上调基因1073个, 下调基因1036个; MD1和SD3相比DEGs最少, 上调基因533个, 下调基因578个; MD1和PD2相比上调基因850个, 下调基因929个。

3.4 与雪峰虫草子座生长发育相关DEGs分析

将DEGs按 \log_2FC 排序, 将 $\log_2FC > 3.0$ 的基因序列提取后分别进行GO和KEGG功能注释分析(图5), 对不同生长阶段两两比对, $\log_2FC > 3.0$ 的DEGs中, PD2 vs SD3最多(147个), 其次是MD1 vs PD2(86个), MD1 vs SD3最少(43个)。对差异显著的基因进行GO功能注释分析发现, MF的基因数目最多, PD2 vs SD3为90个, MD1 vs PD2为69个, MD1 vs SD3为26个; 其次是CC, PD2 vs SD3为60个, MD1 vs PD2为62个, MD1 vs SD3为17个; BP最少, PD2 vs SD3为44个, MD1 vs PD2为37个, MD1 vs SD3为12个。DEGs GO功能注释分析显示, 雪峰虫草子座生长不同阶段生物代谢存在差异。同时也显示, MF中的催化活性(catalytic activity)和结合(binding)、CC中的细胞膜(membrane part)和细胞(cell), 以及BP中的代谢过程(metabolic process)和细胞过程(cellular process)对雪峰虫草子座的生长发育起着重要作用。

DEGs的KEGG通路富集发现, 在雪峰虫草子座生长发育不同阶段均伴随着氨基酸代谢(赖氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸)和碳水化合物代谢, 在菌丝发育成子座原基的过程中同时有聚糖生物合成和代谢(鞘糖脂生物合成)、脂肪酸代谢

(不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢)等初级代谢过程,以及次级代谢产物吡啶二萜生物碱生物的合成。同时发现真菌丝裂原活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路在子座原基和子座生长阶段均显著高表达,这说明MAPK信号通路中的基因对雪峰虫草子座的生长发育起着关键调控作用。

3.5 MAPK信号途径调控雪峰虫草子座生长相关基因挖掘

将雪峰虫草样本两两相比较,共计获得了43个基因或者蛋白(图6,绿色背景所示),提取MAPK途径中的具有显著差异表达的21个基因进行表达模式聚类分析发现,MD1和SD3中基因表达量变化趋势更接近(图7)。同时在3组样品中存在显著差异

表达的基因为0,同时在2组样品中存在显著差异表达的基因有12个。MD1 vs SD3中具有显著差异的仅有3个基因,分别是*ste12*下调,*ptp2,3*和*pbs2*上调,MD1 vs PD2中具有显著差异的基因有15个,上调的基因13个,下调基因3个,PD2 vs SD3中具有显著差异基因为15个,上调基因仅有2个,下调基因为12个。且在MD1 vs PD2和PD2 vs SD3中均存在显著差异表达的9个基因中,仅有*pkc1*在MD1 vs PD2显著下调(图7,绿色字体),在PD2 vs SD3中显著上调。仅在MD1 vs PD2中存在显著差异的基因为4个(图7,蓝色字体),除了*fus3*下调其他基因均上调,仅在PD2 vs SD3中存在显著差异的基因为5个(图7,红色字体),除了*gpd1*和*rho1*上调外其他基因均下调。

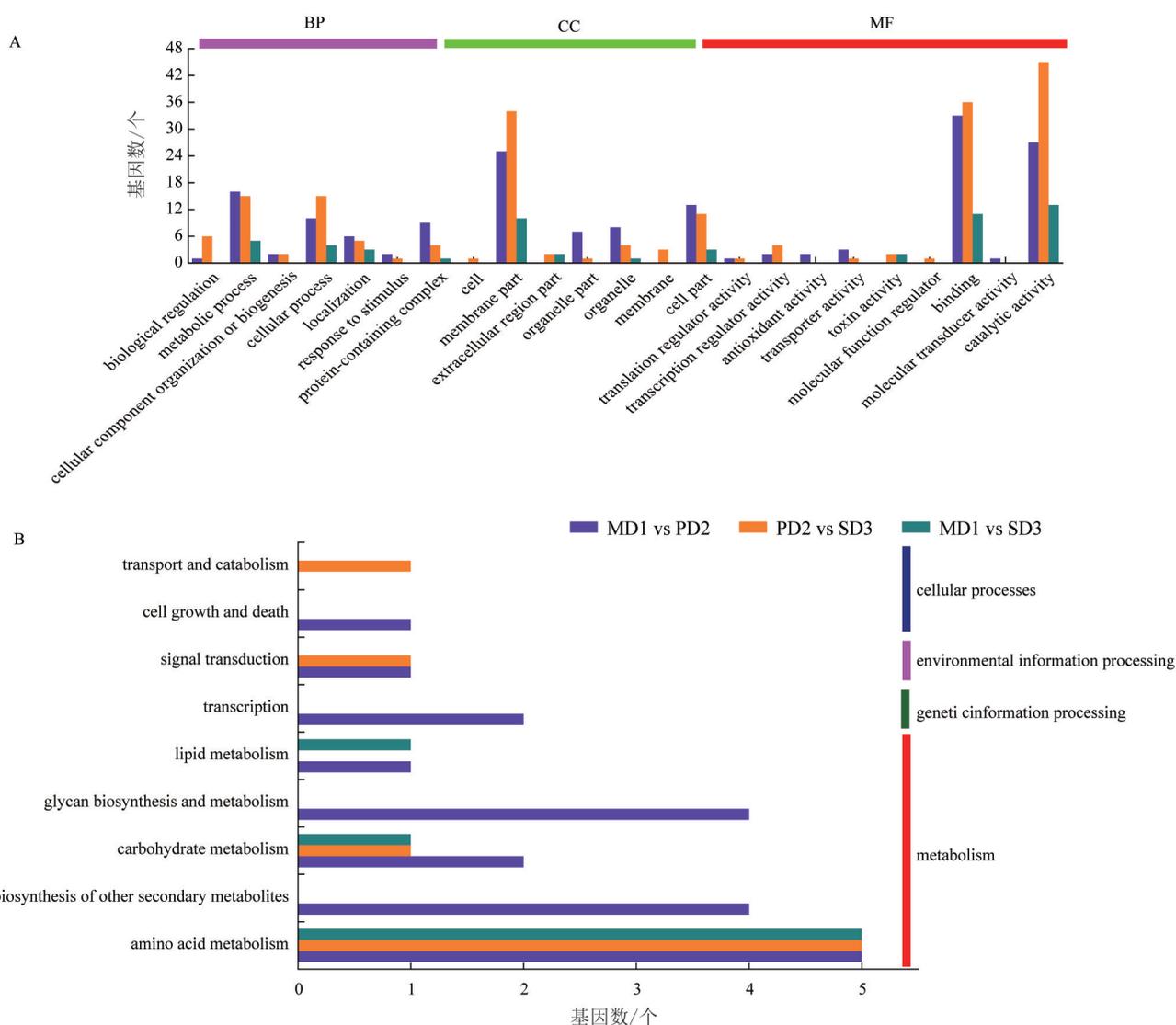


图5 雪峰虫草转录组log₂FC>3.0的差异基因序列GO和KEGG功能富集

MAPK SIGNALING PATHWAY-YEA

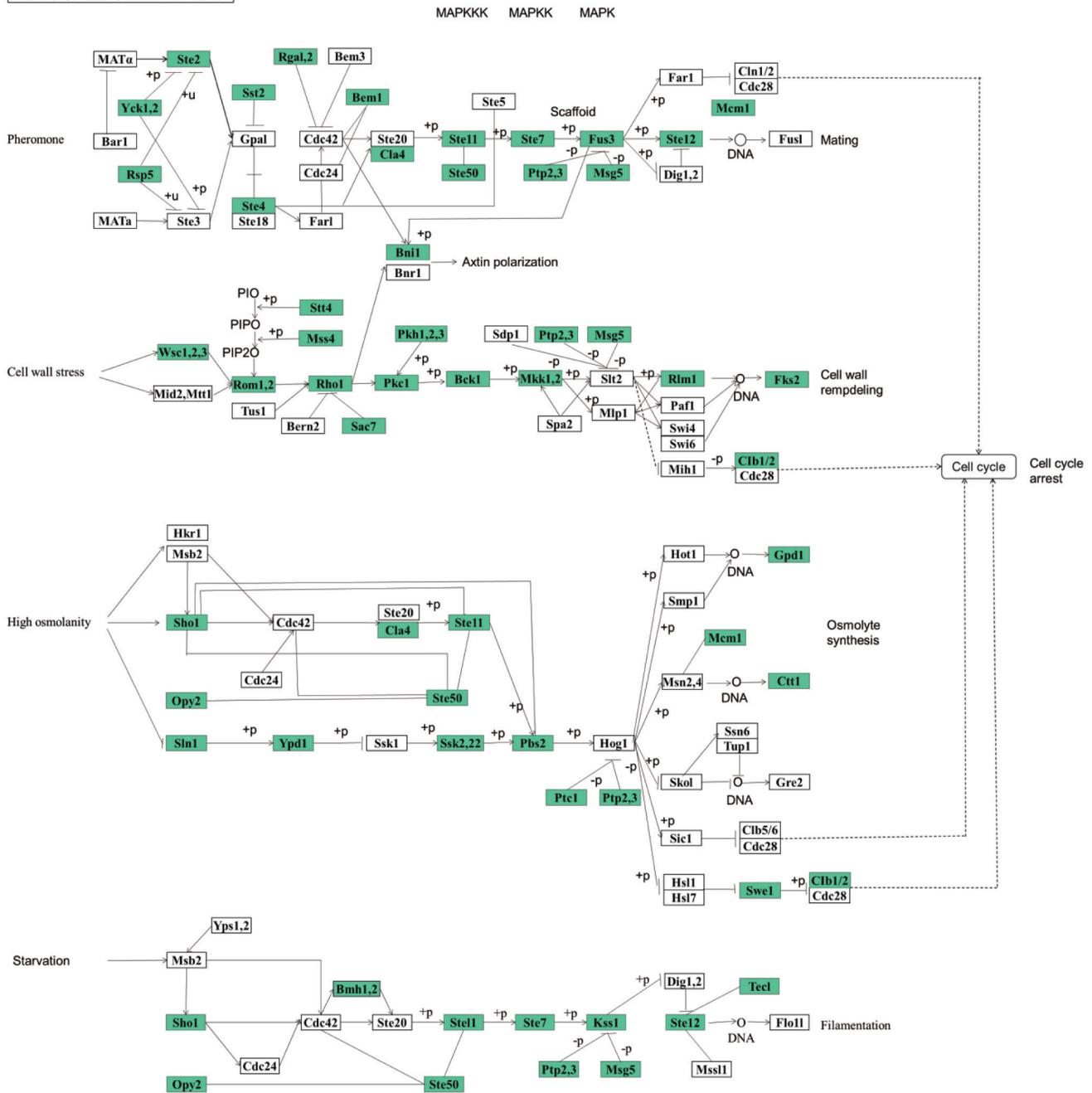
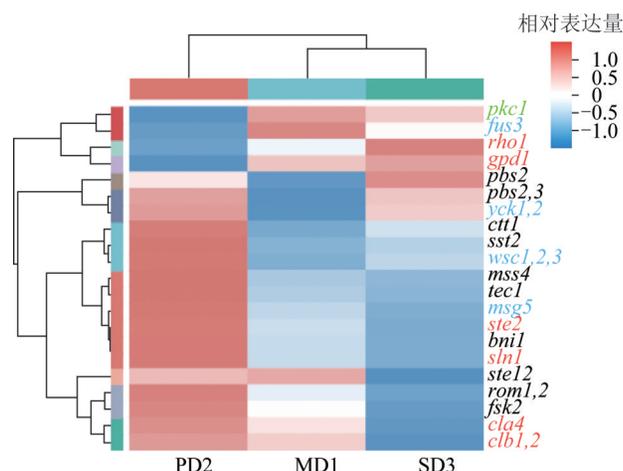


图6 雪峰虫草MAPK信号途径及相关基因表达差异

4 讨论

虫草培育关键技术难题在于提高子座的分化率、产量和主要活性物质的含量。子座生长发育过程包括菌丝体的培育，菌丝体在适宜的营养和环境条件下形成子座原基，进而发育成可食用和药用的子座。虫草子座的生长发育和活性物质积累内外因子的双重调节，外界环境条件如营养、温度、酸碱度、光

照等^[15-16]，内部因素如菌种的质量^[17]、内在基因^[18-19]的调控作用等。本研究在前期子座成功培育的基础上，基于转录组技术深入挖掘雪峰虫草子座生长发育的内在机制，结果发现雪峰虫草子座生长发育与其他大型真菌发育过程一样涉及氨基酸、碳水化合物和脂肪酸等初级代谢过程，这些可能为子座的生长发育提供能量，同时也存在细胞分化及信号转导等生命活动^[20]。然而由于雪峰虫草没有参考基因组，



注：红色代表该基因在样本中表达量较高，蓝色代表表达量较低。

图7 雪峰虫草菌种的MAPK信号途径中相关基因表达热图

基因功能分析的过程中发现诸多基因为假定蛋白或者未命名的蛋白，且部分蛋白在雪峰虫草子座生长发育不同阶段高表达，对这些基因进行深度挖掘，扩展丝状真菌子座生长发育调控机制，为丝状真菌的菌种复壮和种质创新提供新思路。由此可见，雪峰虫草菌种还有大量基因有待深度挖掘。

通过KEGG对差异显著的基因进行功能富集发现MAPK通路被富集。MAPK信号通路是细胞内一种重要的信号转导系统，调节细胞的生长、分化及对环境的应激等多种重要的细胞生理过程^[21]，对真菌有性生殖、细胞壁完整性、菌丝侵染、附着胞形成、致病力和胁迫响应等方面起到非常重要的调控作用^[22]，在酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*^[23]、玉米瘤黑粉*Ustilago maydis*^[24-25]、黄曲霉*Aspergillus flavus*^[26]、灰葡萄孢*Botrytis cinerea*^[27]等真菌物种对其调控生长发育展开了深入的研究。有报道从不同物种挖掘出其子座生长发育不同的关键基因，如*spm*基因突变会抑制黄曲霉的生长^[28]，而*fus3*和*Ste11*基因突变会影响黄曲霉菌核的形成^[29]；*Cdc42*可能参与调控棒瑚菌菌丝的极性生长和细胞周期^[20]；在灰葡萄孢中*bmp1*基因正调控其生长、分生孢子形成、致病力和穿透能力，*bmp3*基因正调控其分生孢子形成、致病力、穿透能力及对氧化胁迫的响应^[30]。由此可见，不同真菌中MAPK途径调控其生长发育的关键基因不同，也有可能存在协同作用。

目前，关于MAPK途径调控虫草生长发育的研究报道较少，Zheng等^[31]通过分析蛹虫草基因组发现其子实体发育主要受MAPK信号途径调控。在雪峰

虫草子座不同生长阶段的样品中，MAPK途径中的多个基因被富集，且存在显著差异。转录组分析结果显示子座不同生长发育阶段上调基因集中在子座原基阶段，下调基因集中在子座阶段，其中2个基因分别在子座原基和子座阶段显著上调，表达量在MAPK所有基因中最高，*Ste2*基因在子座原基阶段显著上调，但在子座阶段又出现下调现象，*Gpd1*基因在子座原基阶段与菌丝体阶段表达无差异，在子座阶段出现显著上调。这预示着*Ste2*可能调控雪峰虫草菌丝体形成子座原基，而*Gpd1*基因可能是雪峰虫草子座原基发育成子座的关键调控基因。虽然尚未见直接报道这2个基因是真菌生长发育调控的关键基因，但有研究认为*Ste7*、*Ste11*、*Ste50*和*Ste12*调控灰葡萄孢致病力、分生孢子的萌发、营养生长和菌核的形成^[32-33]。

因此，雪峰虫草可能通过*Ste2*基因所在的途径调控子座原基的形成，通过*Ypd1*基因所在途径调控子座生长和成熟。而关于雪峰虫草子座生长发育的关键基因有待深入研究。以上结果显示，MAPK信号通路在雪峰虫草子座生长发育过程中有重要作用。

本研究采集雪峰虫草子座生长发育不同阶段的样品，结合不同阶段差异表达基因，基于功能基因GO功能和KEGG功能富集挖掘参与调控雪峰虫草子座生长发育的潜在分子机制，丰富了虫草类真菌的发育机制，为虫草类真菌生产应用提供参考。

参考文献

- [1] WEN T C, ZHU R C, KANG J C, et al. *Ophiocordyceps xuefengensis* sp. nov. from larvae of *Phassus nodus* (Hepialidae) in Hunan Province, Southern China [J]. *Phytotaxa*, 2013, 123(1):41.
- [2] 刘浩, 镇兰萍, 朱如彩, 等. 雪峰虫草性状和显微特征研究[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(14):2820-2824.
- [3] 钟灿, 金剑, 刘浩, 等. 雪峰虫草的研究现状、问题及展望[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(4):107-114.
- [4] WEN T C, LI G R, KANG J C, et al. Optimization of solid-state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris* [J]. *Chiang Mai J Sci*, 2014, 41(4):858-872.
- [5] 廉添添, 董彩虹, 杨涛, 等. 蓝光光照对蛹虫草子实体生长和主要活性成分的影响[J]. *菌物学报*, 2014, 33(4):838-846.
- [6] YANG R Q, GU D Y, GU Z X. *Cordyceps rice wine*: A

- novel brewing process[J]. J Food Process Eng, 2016, 39(6):581-590.
- [7] 张水寒,钟灿,金剑,等.一种雪峰虫草子座及其人工培育方法:ZL 201611187284.5 [P]. 2020-11-27.
- [8] JIN J, ZHONG C, QIN Y, et al. A new cordycepin-producing caterpillar fungus *Ophiocordyceps xuefengensis* with artificial infection to the host, cultivation of mycelia and stromata[J]. FEMS Microbiol Lett, 2017, 364(20):29044404.
- [9] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(7):644-652.
- [10] CONESA A, GÖTZ S, GARCÍA-GÓMEZ J M, et al. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. Bioinformatics, 2005, 21(18):3674-3676.
- [11] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1):27-30.
- [12] LI B, DEWEY C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12:323.
- [13] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. EdgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1):139-140.
- [14] XIE C, MAO X Z, HUANG J J, et al. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Web Server issue):W316-W322.
- [15] 李玲玲,罗合春,胡敏.人工培育冬虫夏草分生孢子的研究[J].食品研究与开发,2016,37(3):187-190.
- [16] 高凌飞,王义祥,翁伯琦.蛹虫草工厂化栽培与系列加工技术研究进展[J].中国农学通报,2014,30(13):93-101.
- [17] 何晓红,赵欢欢,刘飞,等.蛹虫草菌种退化机理及预防措施研究进展[J].食用菌,2012,34(6):1-3.
- [18] YANG T, GUO M M, YANG H J, et al. The blue-light receptor CmWC-1 mediates fruit body development and secondary metabolism in *Cordyceps militaris* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(2):743-755.
- [19] TEICHERT I, PÖGGELER S, NOWROUSIAN M. *Sordaria macrospora*: 25 years as a model organism for studying the molecular mechanisms of fruiting body development[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(9):3691-3704.
- [20] 唐贤,丁祥,董明明,等.棒瑚菌子实体不同发育时期的转录组分析[J].生物技术通报,2019,35(10):119-129.
- [21] ATAY O, SKOTHEIM J M. Spatial and temporal signal processing and decision making by MAPK pathways[J]. J Cell Biol, 2017, 216(2):317-330.
- [22] HAMEL L P, NICOLE M C, DUPLESSIS S, et al. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: Distinct messages from conserved messengers[J]. Plant Cell, 2012, 24(4):1327-1351.
- [23] CHEN R E, THORNER J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(8):1311-1340.
- [24] FELDBRÜGGE M, KÄMPER J, STEINBERG G, et al. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis* [J]. Curr Opin Microbiol, 2004, 7(6):666-672.
- [25] GARRIDO E, VOSS U, MÜLLER P, et al. The induction of sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on Crk1, a novel MAPK protein [J]. Genes Dev, 2004, 18(24):3117-3130.
- [26] ZHANG F, HUANG L H, DENG J L, et al. A cell wall integrity-related MAP kinase kinase kinase AflBck1 is required for growth and virulence in fungus *Aspergillus flavus* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2020, 33(4):680-692.
- [27] LEROCH M, MUELLER N, HINSENKAMP I, et al. The signalling mucin Msb2 regulates surface sensing and host penetration via BMP1 MAP kinase signalling in *Botrytis cinerea* [J]. Mol Plant Pathol, 2015, 16(8):787-798.
- [28] 仲红,杨坤龙,余松,等. MAPK 途径调控黄曲霉产毒和生长发育的机制[C]//中国菌物学会.中国菌物学会第六届会员代表大会(2014年学术年会)暨贵州省食用菌产业发展高峰论坛会议摘要.北京:中国菌物学会,2014:176.
- [29] 李声明.黄曲霉MAPK通路相关基因功能初步研究[D].福州:福建农林大学,2015.
- [30] 袁雪梅,王敏,张强,等.灰葡萄孢丝裂原活化蛋白激酶编码基因 *bmp1* 和 *bmp3* 的功能[J].微生物学通报,2019,46(2):243-251.
- [31] ZHENG P, XIA Y L, XIAO G H, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine [J]. Genome Biol, 2011, 12(11):R116.

- [32] RUI O, HAHN M. The Slr2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization [J]. Mol Plant Pathol, 2007, 8(2): 173-184.
- [33] SCHAMBER A, LEROCH M, DIWO J, et al. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling components and the Ste12 transcription factor in germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea* [J]. Mol Plant Pathol, 2010, 11(1): 105-119.

(收稿日期: 2021-10-25 编辑: 田苗)