



水杨酸诱导下蝙蝠蛾拟青霉转录组分析及虫草酸代谢途径关键酶基因挖掘

唐芦波^{1,2}, 徐娟^{1,2*}, 侯泓言^{1,2}, 吴思昊^{1,2}, 熊科辉³, 贺亮⁴, 李春如⁵, 吴学谦^{1,2*}

- 1 浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江 杭州 310000
- 2 浙江省特色中药资源保护与创新利用重点实验室, 浙江 杭州 310000
- 3 浙江五养堂药业有限公司, 浙江 丽水 323000
- 4 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310000
- 5 浙江泛亚生物医药股份有限公司, 浙江 平湖 314200

唐芦波, 徐娟, 侯泓言, 吴思昊, 熊科辉, 贺亮, 李春如, 吴学谦. 水杨酸诱导下蝙蝠蛾拟青霉转录组分析及虫草酸代谢途径关键酶基因挖掘. 微生物学报, 2022, 62(10): 3751–3767.

Tang Lubo, Xu Juan, Hou Hongyan, Wu Sihao, Xiong Kehui, He Liang, Li Chunru, Wu Xueqian. Transcriptome analysis of *Samsoniella hepiali* induced by salicylic acid and crucial genes digging for metabolic pathways of cordycepic acid. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3751–3767.

摘要:【目的】虫草酸是虫草中重要的活性成分之一, 但其低含量极大地限制了其工业应用。水杨酸(salicylic acid, SA)是一种非生物诱导子, 可以显著提高蝙蝠蛾拟青霉中虫草酸的合成, 但蝙蝠蛾拟青霉虫草酸代谢途径及其对水杨酸的响应尚不明确。本研究旨在获得蝙蝠蛾拟青霉响应SA处理的转录组学信息, 挖掘蝙蝠蛾拟青霉中虫草酸代谢途径关键酶基因。【方法】采用SA诱导培养蝙蝠蛾拟青霉, 8 h后选取诱导和未诱导的菌丝进行转录组高通量测序分析。【结果】测序最终获得40.37 Gb的clean data, 拼接得到20 317条unigene, 平均长度为1 357.13 bp, 功能注释共获得13 592条unigene。差异基因分析共筛选出差异基因2 574个, 其中有1 135个上调, 1 439个下调。KEGG富集分析表明, 差异基因主要富集于细胞周期、减数分裂、半乳糖代谢、DNA复制、糖醇脂类生物合成、甘油脂类代谢等KEGG通路中。进一步分析得到与虫草酸代谢相关的基因13条, 其中参与虫草酸生物合成的基因*glk*、*gpi*、*gla*、*mpi*、*fbp*、*mtld*在SA处理后表达量上调, 而涉及虫草酸消耗的基因*mdh*在SA处理后表达量下调, qRT-PCR验证结果与RNA-Seq数据基

基金项目: 国家自然科学基金(31571795); 浙江农林大学科研发展基金(2016FR010)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31571795) and by the Scientific Research and Development Fund of Zhejiang Agriculture and Forestry University (2016FR010)

*Corresponding author. E-mail: wxq@zafu.edu.cn

Received: 8 February 2022; Revised: 18 March 2022; Published online: 1 June 2022

本一致。【结论】对 SA 诱导后的蝙蝠蛾拟青霉转录组进行分析, 获得虫草酸代谢途径相关的候选基因, SA 能够提高虫草酸合成相关基因表达的同时抑制消耗虫草酸的基因表达, 从而提高虫草酸生物合成量。本研究为 SA 调控蝙蝠蛾拟青霉虫草酸生物合成途径相关基因研究提供了依据, 也为后期开展虫草酸代谢调控机制研究奠定了基础。

关键词: 蝙蝠蛾拟青霉; 水杨酸; 转录组; 虫草酸; 代谢途径

Transcriptome analysis of *Samsoniella hepiali* induced by salicylic acid and crucial genes digging for metabolic pathways of cordycepic acid

TANG Lubo^{1,2}, XU Juan^{1,2*}, HOU Hongyan^{1,2}, WU Sihao^{1,2}, XIONG Kehui³, HE Liang⁴, LI Chunru⁵, WU Xueqian^{1,2*}

1 College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture & Forestry University, Hangzhou 310000, Zhejiang, China

2 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Resources Protection and Innovation of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310000, Zhejiang, China

3 Zhejiang Wuyangtang Pharmaceutical Co., Ltd., Lishui 323000, Zhejiang, China

4 Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310000, Zhejiang, China

5 Zhejiang Bioasia Pharmaceutical Co., Ltd., Pinghu 314200, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] Cordycepic acid is one of the most important active substances in *Samsoniella hepiali*, but the low content greatly restricts its industrial application. Salicylic acid (SA) is an abiotic inducer, and we found that it could increase the content of cordycepic acid in *S. hepiali*. However, the metabolic pathways of cordycepic acid and its response to SA are not clear. This study was designed to obtain the transcriptome information of *S. hepiali* in response to SA treatment, and to explore key enzyme genes for the metabolic pathways of cordycepic acid. **[Methods]** In this study, SA was used to induce *S. hepiali*, and after 8 h treatment, high-throughput transcriptome sequencing was performed on induced and uninduced mycelia. **[Results]** A total of 40.37 Gb clean data was acquired, and 20 317 unigenes with an average length of 1 357.13 bp were constructed. Additionally, 13 592 unigenes were annotated in the public databases NR, NT, KEGG, Swissprot, GO, and Pfam, and 2 574 differentially expressed genes were identified, in which 1 135 were up-regulated and 1 439 were down-regulated. KEGG enrichment analysis demonstrated that the differentially expressed genes were concentrated in the pathways such as cell cycle, meiosis, galactose metabolism, DNA replication, glycolipid biosynthesis, and glyceride metabolism. Furthermore, 13 unigenes involved in metabolic pathways of cordycepic acid were found based on the assignment of KEGG pathway. The expression of genes *glk*, *gpi*, *gla*, *mpi*, *fbp* and *mtld* related to cordycepic acid biosynthesis was all up-regulated after the induction of SA, yet that of the gene *mdh* involved in cordycepic acid consumption was down-regulated, and the qRT-PCR results were in substantial agreement with RNA-Seq data. **[Conclusion]** Transcriptome information of *S. hepiali* induced by SA was obtained, and candidate genes for the metabolic pathways of cordycepic acid were identified. SA improved the expression of the

biosynthetic genes and inhibited the gene transcription related to cordycepic acid consumption, thus increasing the accumulation of cordycepic acid. This study provides reference for regulating the genes related to the biosynthetic pathways of cordycepic acid in *S. hepiali* by SA, and also facilitates the investigation on the regulatory mechanism of cordycepic acid metabolism.

Keywords: *Samsoniella hepiali*; salicylic acid; transcriptome; cordycepic acid; metabolic pathways

蝙蝠蛾拟青霉(*Samsoniella hepiali*)是从新鲜冬虫夏草中分离获得的药用真菌,属于丛梗孢科(*Moniliaceae*),瓶梗青霉属(*Paecilomyces*)^[1]。2020年前普遍使用的学名为*Paecilomyces hepiali*^[2],但由于在早期的系统发育分析中蝙蝠蛾拟青霉的系统地位不明确,所以Wang等利用多基因序列数据和大规模分类单元取样构建了一个新的系统发育框架,提出以*Samsoniella hepiali*组合命名^[3]。在国家药品与食品监督管理局2001年颁布的《真菌类保健食品评审规定》中蝙蝠蛾拟青霉被列为2种人工虫草生产的菌种之一^[4-5],在工业化发酵虫草中有着广泛的应用。冬虫夏草作为我国的一味传统名贵中药材有着悠久的历史,在我国古代医书《本草从新》中记载虫草有保肺、益肾、化血补气、止咳等功效。蝙蝠蛾拟青霉作为天然虫草的优良替代物同样有着极高的药用价值。研究表明蝙蝠蛾拟青霉的rDNA-ITS序列与天然虫草的序列具有72%的一致性^[6],并且人工发酵产生的活性物质与天然虫草成分相似,目前从中分离获得的活性物质主要有腺苷、虫草素、虫草多糖、虫草酸、甾醇、大量脂肪酸和无机元素^[7-8],这些活性组分具有抗肿瘤、降血糖、抗炎、调节免疫等作用^[9],在抗肿瘤方面蝙蝠蛾拟青霉对膀胱癌、HeLa、HepG2和MCF-7等肿瘤细胞均具有抑制作用^[10-11]。此外,在小鼠实验中蝙蝠蛾拟青霉醇提物被证明可以降低小鼠血糖并减轻胰岛内炎症减少 β 细胞死亡^[12]。

虫草酸(cordycepic acid)即D-甘露醇($C_6H_{14}O_6$),属于糖醇类物质^[13-14],是蝙蝠蛾拟青霉发酵菌丝的主要活性成分,通常被用作评价人工发酵虫草质量的指标之一。研究表明它能够改善脂多糖诱导的HSCs炎症和TGFB1诱导的成纤维细胞反应^[15]。到目前为止,人工虫草中仅中国被毛孢(*Ophiocordyceps sinensis*)和蛹虫草(*Cordyceps militaris*)中有关虫草酸合成相关的功能基因被成功解析^[16-18],而蝙蝠蛾拟青霉中虫草酸的研究主要集中于提取工艺、分离检测、活性评价等方面,关于其生物合成途径解析及代谢调控的研究鲜少。Yu等报道了蝙蝠蛾拟青霉的基因组,公布了34.6 Mb的基因组草图序列^[19];宋利璞对蝙蝠蛾拟青霉不同发酵阶段的转录组分析揭示了部分化合物的代谢通路信息及酶基因^[20]。但蝙蝠蛾拟青霉虫草酸生物合成途径及代谢调控机制有待解析。

水杨酸(salicylic acid, SA)作为一种非生物诱导子,能够显著诱导中药中次生代谢产物的合成,是一种有效的代谢调控策略。在水杨酸诱导的丹参悬浮培养细胞中,研究人员发现水杨酸能不同程度地增加丹参酚酸的合成,激活超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶、苯丙氨酸解氨酶和TAT酶^[21-22]。此外,外源水杨酸可以促进白花丹根中白花丹素的合成^[23];藏红花在不同浓度水杨酸处理下藏红花鳞茎叶片中总多酚和黄酮含量、PAL活性和基因表达均有不同程度的增加^[24]。而在植物黄花蒿中,水杨酸可以通过增加活性氧的爆发和通过提高与

青蒿素生物合成相关的基因的表达来激活青蒿素生物合成^[25]。本课题组在前期研究中发现不同浓度的 SA 处理蝙蝠蛾拟青霉后, 其虫草酸的含量得到了显著的提升。因此作者推测 SA 诱导可能会激活蝙蝠蛾拟青霉中虫草酸代谢相关基因的表达。本研究利用外源 SA 诱导蝙蝠蛾拟青霉, 以未诱导组作为对照, 利用高通量测序平台进行转录组测序, 构建 SA 处理前后蝙蝠蛾拟青霉的转录组文库, 分析差异基因转录表达谱, 挖掘与蝙蝠蛾拟青霉虫草酸代谢相关的关键基因, 以期揭示 SA 处理后蝙蝠蛾拟青霉的转录组整体特征及虫草酸代谢相关基因的差异表达, 为阐明蝙蝠蛾拟青霉虫草酸生物合成途径及代谢调控机制等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料

蝙蝠蛾拟青霉菌种购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC), 编号 3.17103; PDA 培养基, 无水麦芽糖, 葡萄糖, 酵母提取物, 蛋白胨, 硫酸镁, 磷酸二氢钾, 水杨酸(国药试剂); 10×loading buffer 缓冲液, 琼脂糖, 50×EDTA 缓冲液, Gel Red 核酸染料, Spin Column Fungal Total RNA Purification Kit 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司), HiScript IIQ-RT SuperMix Synthesis Kit, ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix-kit 试剂盒(南京诺维赞有限公司)。

1.1.2 仪器

QYC-2102 恒温培养摇床(上海圣科仪器有限公司)、立式蒸汽灭菌锅(上海博讯医疗生物仪器有限公司)、恒温水浴锅(上海赫田科学仪器有限公司)、CF-RN 高速冷冻离心机(日立)、

Colibri 超微量分光光度计(伯赫)、PowerPac 电泳仪(伯乐)、凝胶成像系统 JY04S-3C (北京君意东方电泳设备有限公司)、T100PCR 仪(伯乐)、CFX96 荧光定量 PCR 仪(伯乐)等。

1.2 SA 诱导条件

取 200 μ L 过滤除菌的 SA 母液添加至 100 mL 蝙蝠蛾拟青霉发酵液中, 使其浓度为 200 μ mol/mL, 在 25 $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下诱导培养 8 h, 空白对照采用同体积无菌水处理。诱导结束后, 取发酵液离心去上清, 菌丝液氮速冻后保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3 RNA 提取及 cDNA 文库构建

用试剂盒提取样本总 RNA, 清除 gDNA, 检测完整性后用带有 Oligo(dT)的磁珠从总 RNA 中纯化 mRNA。在合成反应缓冲液中片段化, 用打断后的 mRNA 为模板合成第一链 cDNA 以及二链 cDNA, 之后进行纯化回收、黏性末端修复、cDNA 的 3'端加入 poly(A)尾部并连接接头, 然后进行片段大小选择, 最后进行 PCR 扩增。扩增产物被纯化后在 Agilent Bioanalyzer 2100 系统上评估文库质量。

1.4 测序及数据组装

使用 Illumina HiSeqTM 2000 150PE 平台进行测序。利用 Trinity^[26]软件根据测序数据完成转录组的组装, min_kmer_cov 默认设置为 2, 所有其他参数为默认设置。

1.5 功能注释

使用 BLAST 软件将 unigene 序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、eggNOG4.5、KEGG 等数据库进行序列比对和功能注释预测 ($E < 1 \times 10^{-5}$), 预测 unigene 的氨基酸序列后使用 HMMER 软件与 Pfam 数据库比对 ($E < 1 \times 10^{-10}$), 获得 unigene 的注释信息。

1.6 差异基因表达水平分析

使用 DESeq R 软件包(1.10.1)进行 2 组的差

异表达基因分析。DESeq 提供统计程序, 使用基于负二项分布的模型确定数字基因表达数据中的差异表达。使用 Benjamini 和 Hochberg 的方法对产生的 P 值进行了调整, 以控制假发现率。通过 DESeq 发现的调整后 P 值 <0.05 的基因被指定为差异表达基因。

1.7 蝙蝠蛾拟青霉虫草酸代谢相关基因的挖掘与差异性分析

参考文献中提出的中国被毛孢虫草酸合成途径, 结合 KEGG 注释结果和数据库中已知的基因信息, 利用本地 BLAST 进行检索比对, 确定本转录组数据库中与蝙蝠蛾拟青霉虫草酸代谢相关的基因。提取转录组数据库中关键基因的 FPKM 值进行差异性分析。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测

采用 qRT-PCR 对蝙蝠蛾拟青霉转录组数据 (CK 和 SA) 中虫草酸代谢相关的差异基因进行表达量检测。使用 *Actin* 作为内参基因, 并根据各核苷酸序列片段设计 qRT-PCR 引物 (表 1)。PCR 反应体系为 20 μ L: cDNA 约 150 ng, ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (2 \times) 10 μ L, 正反引物各 1.0 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。熔解曲线条件设置为 60–95 $^{\circ}$ C 15 s,

每升高 0.5 $^{\circ}$ C 时收集一次荧光, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算, 每组样品设置 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 SA 对蝙蝠蛾拟青霉生长及虫草酸含量影响

SA 诱导处理 8 h 对蝙蝠蛾拟青霉生长及虫草酸含量的影响如图 1 所示。结果表明, 200 μ mol/mL 的 SA 诱导 8 h 蝙蝠蛾拟青霉生物量与未诱导组相比无显著变化, 而诱导后虫草酸含量显著增加, 达到 26.34 mg/g, 较未诱导组提高 2.34 倍, 说明 SA 对虫草酸的生物合成具有显著诱导调控作用。

2.2 RNA 提取与质量控制

用试剂盒提取蝙蝠蛾拟青霉总 RNA 然后进行质量检测, 结果显示, RNA 质量和完整性较高 (RIN >7.5)。将各组样品的 RNA 反转录成 cDNA 后进行高通量测序, 构建 CK 和 SA 处理组的转录组文库。

2.3 转录组测序与组装结果

用高通量测序平台进行测序, 质量控制处理后共得到 134 798 202 条 clean reads 和 40.37 G clean data, Q₃₀ 碱基平均值为 94.38%, GC 含量为 57.73%, 获得数据质量较好, 均达到后续分析标准。

表 1 荧光定量引物序列

Table 1 Sequence of primers used for qRT-PCR

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Length of PCR product/bp
<i>Actin</i>	CTCCATCATCAAATGCGACG	TCAACTCCTTTTGCATGCGA	148
<i>glk</i>	GGACGAGATTGACAACCTGCGACTG	AGGATAGATTGGTGCTTGCCGACAGA	114
<i>hk-1</i>	ACAGTAACGCGACATTGTCAGCAT	AACTCCAAGCAAGAGCCACAGGAATAG	177
<i>hk-2</i>	TTGCCGACTGTCTTCACCAATTCCTC	GCCCTCAACGCCATCAATATCAAAGC	167
<i>gpi</i>	ATTGGTATTGGTGGTTCCGACCTTGG	GGTAATGTGAGTGCCGTCAATGTTGGA	117
<i>gla</i>	GCTGACAAGGTTGCCGACTACA	GCTGACAAGGTTGCCGACTACA	473
<i>fbp</i>	TCCAGTTCTCCTTCAAGTCCAT	TCCAGTTCTCCTTCAAGTCCAT	201
<i>hxpB</i>	CGAGTTTGGCAAGCGTCTGGTT	CGAGTTTGGCAAGCGTCTGGTT	244
<i>mdh</i>	GTGGTGAAGACTTTGGCAAGATTGAC	CTGACGCTTAAAGACTTCTCCGACATACT	168
<i>mtld</i>	AGAGGAACCGAAGCCCATTGATGT	CGTTAATGTGGCTGTACTGCTGTAGG	95

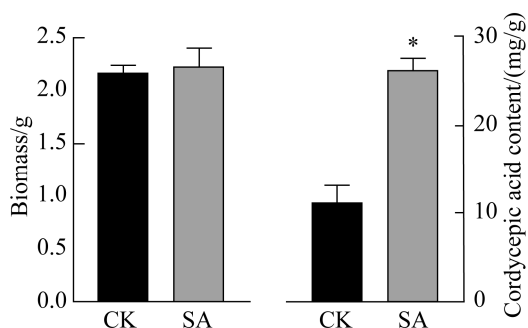


图1 SA诱导前后蝙蝠蛾拟青霉生长及虫草酸含量影响

Figure 1 Effects of SA on biomass and cordycepic acid in *Samsoniella hepiali*. *: represents a significant difference, $P < 0.05$.

利用 Trinity 软件对序列进行组装, 组装获得 59 765 条 transcripts, 在 transcripts 数据的基础上进一步对序列进行组装, 共获得 20 317 条 unigene, 详细结果如表 2 所示。

2.4 Unigene 功能注释及分析

通过 BLAST 比对和 HMMER 比对, 最终获得 13 592 个有注释信息的 unigene (表 3)。其中 KEGG 和 COG 数据库中注释的 unigene 数量在 6 000 条以下, 其余数据库的注释数量均超过 6 000 条, 在 eggNOG 数据库中的注释数最多, 为 12 090 条。

表 2 蝙蝠蛾拟青霉组装结果统计

Table 2 Summary of transcript assembly generated from *Samsoniella hepiali*

Length range/bp	Transcript	Unigene
200–300	5 689 (9.52%)	5 178 (25.49%)
300–500	4 243 (7.10%)	3 070 (15.11%)
500–1 000	6 393 (10.70%)	3 398 (16.72%)
1 000–2 000	11 001 (18.41%)	3 833 (18.87%)
2 000+	32 439 (54.28%)	4 838 (23.81%)
Total number	59 765	20 317
Total length	163 736 242	27 572 860
N50 length	4 206	2 549
Mean length	2 739.67	1 357.13

表 3 蝙蝠蛾拟青霉 unigenes 注释结果

Table 3 Statistics of functional annotation for *Samsoniella hepiali* sequences in public databases

Annotation database	Number of annotations	Percentage/%
COG	5 219	25.69
GO	6 807	33.50
KEGG	4 414	21.73
KOG	6 675	32.85
Pfam	9 035	44.47
Swissprot	7 085	34.87
eggNOG	12 090	59.51
NR	12 088	59.50
All annotated	13 592	66.90

蝙蝠蛾拟青霉转录组中发现 1 344 条 unigene 参与到 81 个 KEGG 代谢标准通路中, 其中排名前 5 的通路为抗生素生物合成 (biosynthesis of antibiotics)、氨基酸生物合成 (biosynthesis of amino acids)、碳代谢 (carbon metabolism)、氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)、糖酵解和糖异生 (glycolysis/ gluconeogenesis) (图 2)。

2.5 差异表达基因的分析与鉴定

以无菌水处理的 CK 组作为对照筛选 SA 诱导下的差异表达基因 (DEGs)。如图 3 所示, 作者使用 DESeq2^[27] 对 SA 处理和对照蝙蝠蛾拟青霉样本进行分析, 筛选阈值为 $P_{adj} < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| > 1.5$ 。共鉴定出了 2 574 条 DEGs, 其中上调 1 135 条, 下调 1 439 条, 该结果表明蝙蝠蛾拟青霉中大量基因参与了 SA 诱导的非生物胁迫应答。

为了阐明这些 DEGs 的特定生物学功能, 进行了 Go 富集分析。图 4 表明, DEGs 主要涉及催化活性 (catalytic activity, 703 条)、代谢过程 (metabolic process, 690 条)、细胞过程 (cellular process, 606 条)、单组织过程 (single-organism process, 596 条)、结合位点

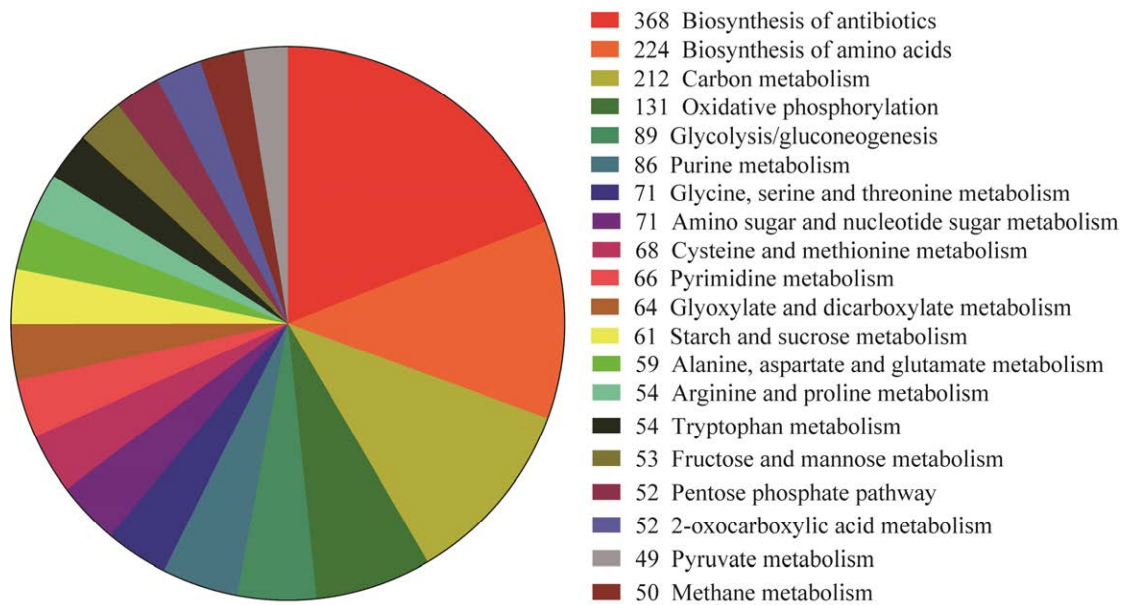


图2 Unigene的KEGG代谢通路分类(数量前20)

Figure 2 KEGG pathway analysis of transcriptome unigenes (number of the top 20).

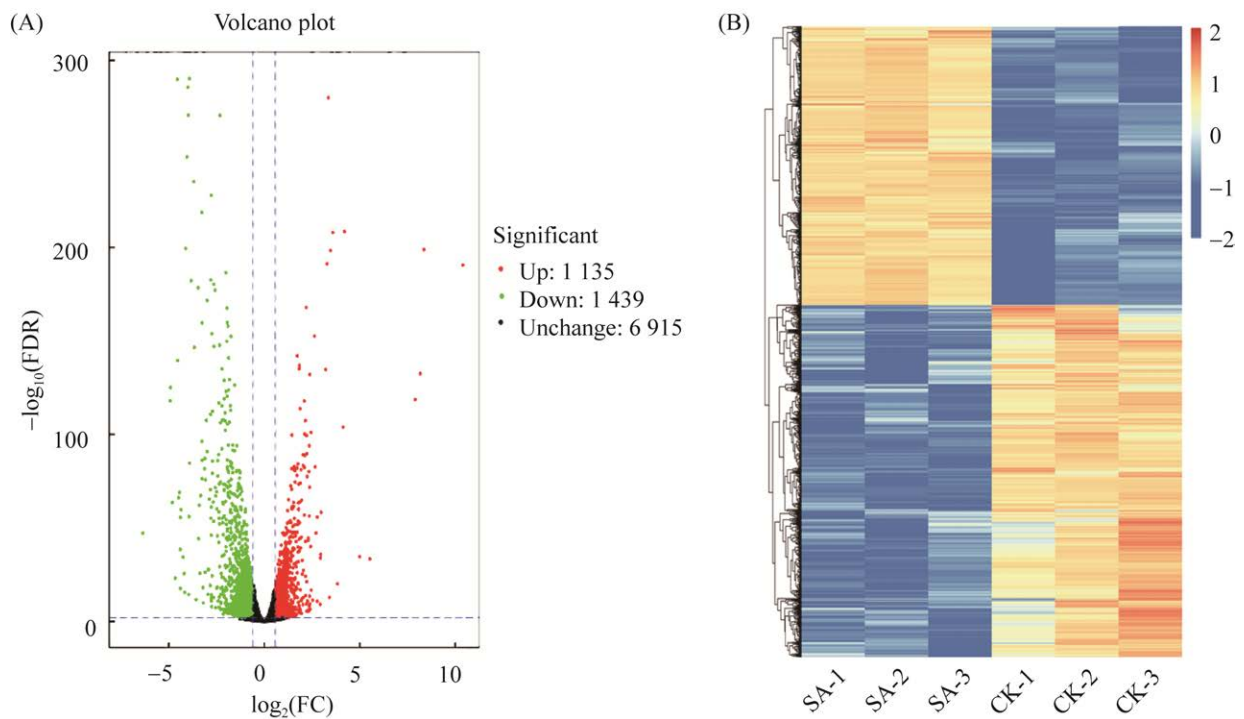


图3 差异表达基因火山图(A)和差异基因聚类分析(B)

Figure 3 Volcano plot of differentially expressed genes (A) and cluster analysis of differential genes (B).

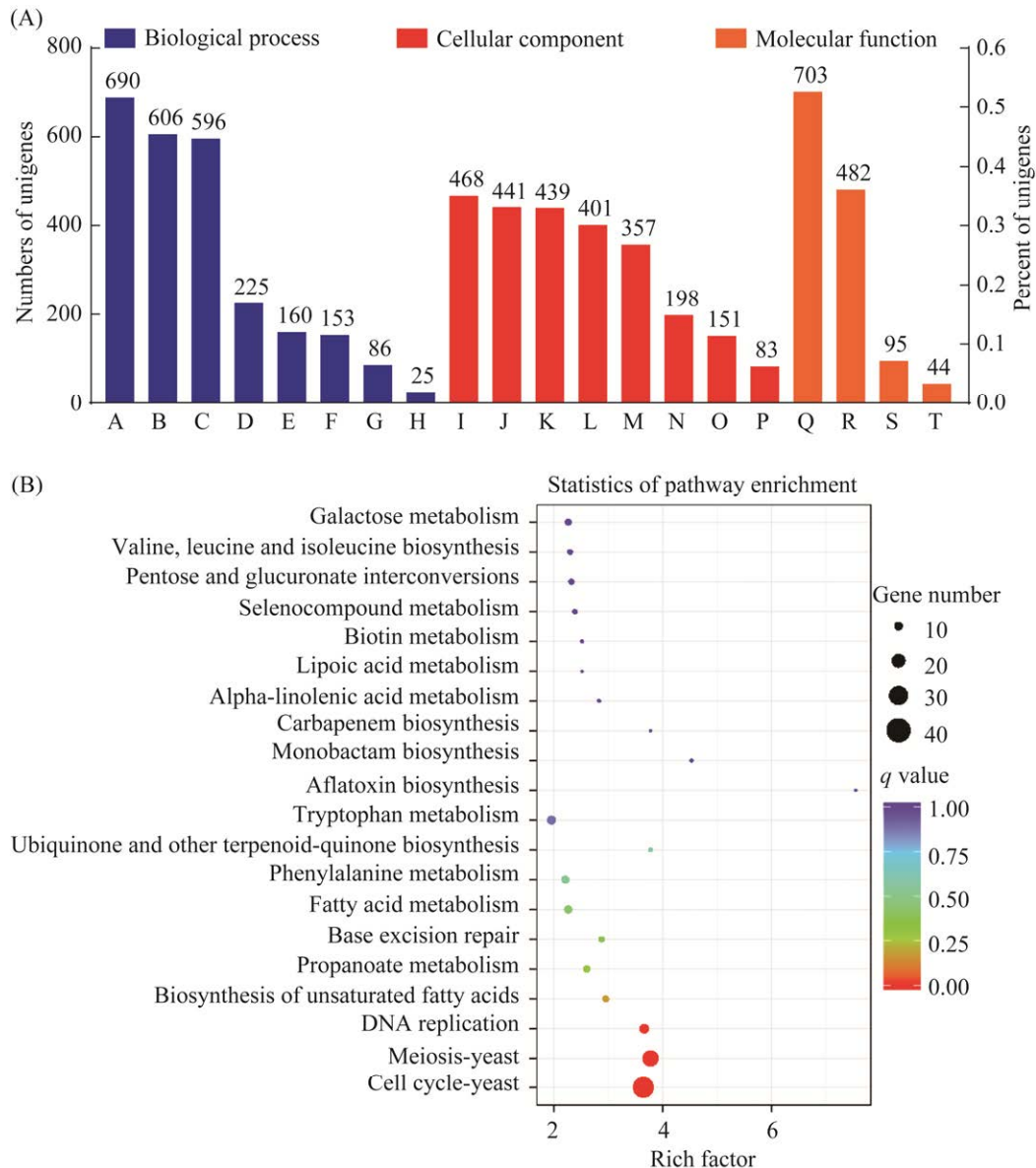


图 4 差异表达基因 Go 注释分类(数量前 20)(A)和 KEGG 代谢通路富集(B)

Figure 4 Go annotation (number of the top 20) (A) and KEGG pathway annotation (B) of differentially expressed genes. A: metabolic process; B: cellular process; C: single-organism process; D: localization; E: biological regulation; F: cellular component organization or biogenesis; G: response to stimulus; H: reproduction; I: membrane; J: cell; K: cell part; L: membrane part; M: organelle; N: organelle part; O: macromolecular complex; P: membrane-enclosed lumen; Q: catalytic activity; R: binding; S: transporter activity; T: nucleic acid binding transcription factor activity.

(binding, 482 条)、膜(membrane, 468 条)、细胞(cell, 441 条)、细胞部位(cell part, 439 条)、膜部位(membrane part, 401 条)以及细胞器(organelle, 357 条)。此外, 我们利用 KEGG 途

径富集分析解析了响应 SA 诱导的生物途径, 结果表明有 355 条 DEGs 被分配到了 KEGG pathway 数据库中, 共涉及 106 个代谢通路。富集程度最高的前 20 条代谢通路如图 3 所示, 其

中 DEGs 参与最多的前 5 条通路为抗生素生物合成(biosynthesis of antibiotics, 52 条)、细胞周期(cell cycle, 42 条)、减数分裂(meiosis, 31 条)、碳代谢(carbon metabolism, 27 条)和氨基酸生物合成(biosynthesis of amino acids, 27 条)。而我们比较关注的半乳糖代谢(galactose metabolism)、果糖和甘露糖代谢(fructose and mannose metabolism)以及糖酵解(glycolysis/gluconeogenesis)涉及到的 DEGs 分别为 9 条、8 条和 7 条。差异基因富集分析结果表明,蝙蝠蛾拟青霉通过调节抗生素合成、氨基酸代谢、碳水化合物代谢以及增强信号转导来响应 SA 的诱导胁迫。

2.6 蝙蝠蛾拟青霉虫草酸代谢的关键基因筛选

对蝙蝠蛾拟青霉转录组注释所得的

unigene 进行分析,共筛选鉴定到参与虫草酸代谢的 9 个关键酶,共 13 条 unigene,详细信息见表 4。然后利用 TBtools 工具对 13 条 unigene 进行了保守结构域预测,结果如图 5 所示, *mdh* (c10386.graph_c0、c7065.graph_c1、c15676.graph_c1) 拥有共同的保守结构域 NADB_Rossmann super family, 根据 NCBI 数据库注释结果反映 NADB 结构域存在于许多代谢途径的脱氢酶中,这也符合 *mdh* 的注释结果; *glk* (c14612.graph_c0、c17058.graph_c0)保守结构域属于 COG5026 superfamily; *hk* (c14123.graph_c0、c11278.graph_c0)的结构分析表明每条 unigene 均存在 2 个保守结构域,分别是 *hk-1* 和 *hk-2*。其余 6 条 unigene 的预测结果表明它们的保守结构域相互独立不存在重复。

表 4 蝙蝠蛾拟青霉虫草酸生物合成相关候选基因

Table 4 Candidate genes involved in cordyceps acid biosynthesis identified in *Samsoniella hepiali*

Gene name	Ko Number	Number	Annotation function
Glucokinase (<i>glk</i>)	K00845	2	Carbohydrate transport and metabolism glucokinase activity. A group of enzymes found in invertebrates and microorganisms that are highly specific for glucose.
Hexokinase (<i>hk</i>)	K00844	2	Carbohydrate transport and metabolism hexokinase activity. D-glucose, D-mannose, D-fructose, sorbitol, and D-glucosamine can act as acceptors; ITP and dATP can act as donors. The liver isoenzyme has sometimes been called glucokinase.
Glucose-6-phosphate isomerase (<i>gpi</i>)	K01810	1	Carbohydrate transport and metabolism glucose-6-phosphate isomerase activity
Alpha-galactosidase (<i>gla</i>)	K07407	1	Carbohydrate transport and metabolism alpha-galactosidase activity
Mannose-6-phosphate isomerase (<i>mpi</i>)	K01809	1	Carbohydrate transport and metabolism mannose-6-phosphate isomerase activity
Fructose-1,6-bisphosphatase (<i>fbp</i>)	K03841	1	Carbohydrate transport and metabolism fructose-1-6-bisphosphatase activity, N-terminal domain
Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase (<i>mild</i>)	K00009	1	Carbohydrate transport and metabolism mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase activity
Mannitol-1-phosphate (<i>hspb</i>)	K24204	1	Coenzyme transport and metabolism. Energy production and conversion oxidoreductase activity
Mannitol dehydrogenase (cytochrome)(<i>mdh</i>)	K00045	3	Enoyl-(acyl carrier protein) reductase, short chain dehydrogenase. KR domain NAD(P)-binding domain protein oxidoreductase activity

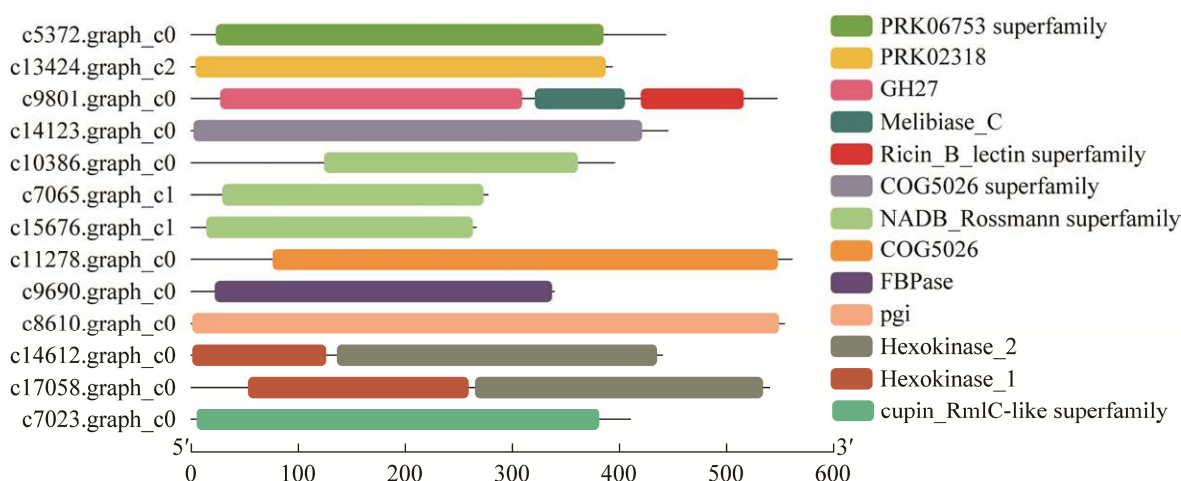


图 5 关键酶基因保守结构域预测

Figure 5 Prediction of conserved structural domains of key enzyme genes.

目前已报道的虫草酸生物合成主要有两种^[28]，一种以葡萄糖为底物，在葡萄糖激酶的作用下转变为葡萄糖-6-磷酸，然后葡萄糖磷酸异构酶将葡萄糖-6-磷酸异构化为果糖-6-磷酸，经过甘露醇-1-磷酸脱氢酶将果糖-6-磷酸转化成甘露醇-1-磷酸，该过程需要 NADH 的辅助并产生 NAD⁺，最后在甘露醇磷酸酶的作用下将甘露醇-1-磷酸去磷酸化生成虫草酸；另外一种主要以混合底物生产甘露醇，当底物是葡萄糖和果糖的混合物或者只存在果糖时，都先转化成葡萄糖-6-磷酸，然后进入磷酸戊糖途径，在产生 NADH 的同时将果糖在甘露醇脱氢酶的作用下转化成虫草酸同时生产 NAD⁺。在本研究转录组数据中以上关键酶均得到了注释。其中 *hk-1*、*hk-2* 和 *gpi* 与 Lin 等对不同生长期中被毛孢的转录组研究中发现的关键酶己糖激酶和葡萄糖磷酸异构酶一致^[29]，不同的是，在蝙蝠蛾拟青霉中挖掘到了与 *hk-1*、*hk-2* 具有相同功能但特异性更强的 *glk* 基因。本研究还发现对半乳糖降解起关键作用的 *gla* 基因表达量显著上调，较对照组提高了 13.14 倍，而半乳糖降解后经过 *hk* 和 *mpi* 的作用可以转化成虫草酸合成

的关键前体物质果糖-6-磷酸。这一结果和前期实验中发现的 SA 能够抑制虫草多糖合成结论相一致，因而推测部分葡萄糖转化成了半乳糖，而在 SA 的刺激下 *gla*、*hk* 和 *mpi* 的表达量提高，将半乳糖转化成果糖-6-磷酸，最终进入虫草酸合成途径从而形成了一条虫草酸合成的新补充途径。另外我们发现 SA 处理的转录组数据中 *fbp* 的表达量提高了 1.58 倍，该酶可以促使果糖转化成果糖-6-磷酸，而本研究培养基底物中没有添加果糖而是添加了麦芽糖，所以我们认为底物中麦芽糖降解后导致葡萄糖含量的增多，其中一部分被转化成了果糖然后再转化成果糖-6-磷酸进入虫草酸合成途径，在其他文献中并未有类似报道。最后果糖-6-磷酸在 *mtld* 和 NADH 的作用下合成甘露醇-1-磷酸，进一步合成虫草酸，这与王晓瑞所报道的结果一致^[30]。根据以上分析构建蝙蝠蛾拟青霉虫草酸生物合成途径，如图 6 所示，底物葡萄糖经由 3 条途径合成关键前体物质果糖-6-磷酸，再经甘露醇-1-磷酸脱氢酶将果糖-6-磷酸转化成甘露醇-1-磷酸，最后在甘露醇磷酸酶的作用下甘露醇-1-磷酸去磷酸化生成虫草酸。

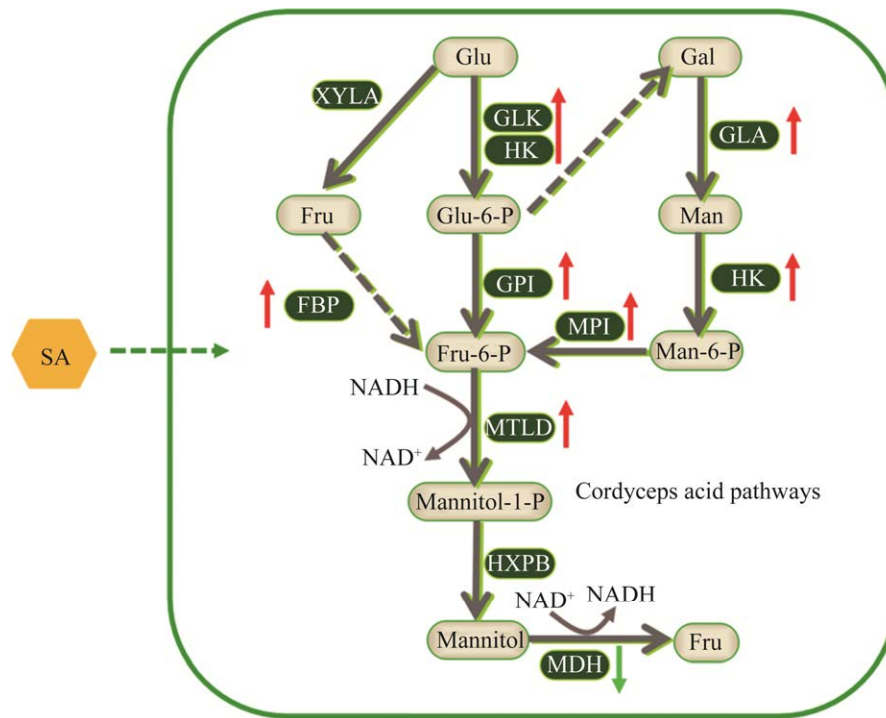


图 6 SA 对蝙蝠蛾拟青霉菌草酸代谢的调控作用

Figure 6 Regulation of SA on the metabolic pathways of cordycepic acid in *Samsoniella hepiali*. GLK: glucokinase; HK: hexokinase; GPI: glucose-6-phosphate isomerase; GLA: alpha-galactosidase; MPI: mannose-6-phosphate isomerase; MTL1D: mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase; HXPB: mannitol-1-phosphate; MDH: mannitol dehydrogenase (cytochrome); XYL1A: xylose isomerase; FBP: fructose-1,6-bisphosphatase I.

在构建的蝙蝠蛾拟青霉菌草酸生物合成途径中, *hk* 和 *glk* 作为虫草酸生物合成的起始酶, 催化底物葡萄糖合成葡萄糖-6-磷酸。该物质不仅是虫草酸合成的前体物质, 也是糖酵解途径的重要中间产物, 对于虫草酸代谢十分重要, 因此是虫草酸合成的关键酶基因。SA 诱导提高了 *glk* 和 *hk* 酶基因表达, 可促进前体物质葡萄糖-6-磷酸的积累, 同时增强糖酵解途径, 从而促进 NADH 等辅酶因子的形成, 有利于虫草酸的合成。*gpi* 是直接催化葡萄糖-6-磷酸合成果糖-6-磷酸的关键酶基因, 此外 *gla*、*hk* 和 *mpi* 是经半乳糖合成果糖-6-磷酸的酶基因, *fbp* 是由果糖合成果糖-6-磷酸的酶基因, 以上合成关键前体物质果糖-6-磷酸的酶基因在 SA 的诱导

下均上调表达, 促进果糖-6-磷酸的积累。果糖-6-磷酸不仅是虫草酸合成的前体物质, 也是糖酵解等多种代谢途径的中间产物, 因此催化果糖-6-磷酸合成甘露醇-1-磷酸的 *mtld* 基因是使代谢流向虫草酸的分支途径基因, 也是虫草酸合成的关键酶基因。SA 诱导提高了 *mtld* 基因表达量, 使果糖-6-磷酸更多地流入虫草酸代谢途径。此外, *mtld* 催化活性需要辅酶因子的参与, 有研究指出在甘露醇合成途径中 *mtld* 只表现出还原活性而没有氧化活性, 需要辅酶因子 NADH/NADPH 活化, 并且以 NADH 作为辅酶因子时要比以 NADPH 作为辅酶因子时的酶活高 20%^[31]。本研究转录组数据表明, 糖酵解途径基因表达提高, 可为虫草酸代谢提供能量

及辅酶因子，从而促进果糖-6-磷酸转化为甘露醇-1-磷酸。最后，*hxp*催化甘露醇-1-磷酸合成虫草酸，该酶具有较高的活性，在低表达时即可高效催化虫草酸的合成，因此不是虫草酸合成限速酶。虫草酸在辅酶因子 NADH 存在时可经 MDH 酶转化为果糖，因此消耗虫草酸的 *mdh* 也是虫草酸代谢的关键酶基因。在 SA 的作用下 *mdh* 的表达量降低抑制虫草酸消耗的同时也降低了 *mdh* 与 *mtld* 竞争 NDAH，使得 NDAH 更多地被 *mtld* 所利用提高了虫草酸合成关键限速步骤的反应速度。

2.7 蝙蝠蛾拟青霉虫草酸代谢途径关键基因的启动子分析

利用 PlantCARE 对筛选到的虫草酸生物合成途径基因的上游启动子区域的顺势作用元件进行了分析，结果如图 7 所示。*Glk* (c14612.graph_c0、17058.graph_c0)、*gla* (c9801.graph_c0)、*mpi* (c7023.graph_c0)、*mtld* (c13424.graph_c2)、*fbp* (c9690.graph_c0) 和 *mdh* (c10386.graph_c0、7065.graph_c1) 都存在水杨酸结合位点，这表明水杨酸可直接作用于这些基因从而引起虫草酸代谢关键基因表达量的变

化。而且 13 条 *unigene* 均存在不同类型的激素响应元件，如赤霉素、生长素和脱落酸等，还发现了参与防御应激响应的作用元件，这可能与 SA 诱发生物的获得性免疫有关。除此之外，我们还发现这些启动子序列上都存在 MYB 转录因子的结合位点，而转录组数据表明 SA 处理下多个 MYB 转录因子的表达量上调，表明 MYB 转录因子可能在 SA 调控虫草酸代谢途径的过程中发挥重要功能。

2.8 蝙蝠蛾拟青霉虫草酸代谢途径关键基因的表达分析

为了验证转录组数据的准确性，选取 *actin* 为内参基因对挖掘到的 9 个关键酶基因进行荧光定量 PCR 验证(图 8)。结果表明 *glk*、*gpi*、*gla*、*fbp*、*mtld*、*hxp*、*mdh* 的相对表达量与转录组测序表达量变化趋势基本一致，其中 *GLA* 的表达量变化最为明显，而转录组数据中 *hk-1* 和 *hk-2* 表达量无明显差异，但其表达在 qPCR 检测结果中均得到了上调，其中 *hk-1* 的提高更加明显。综上所述，SA 诱导处理能够显著上调虫草酸生物合成相关基因表达同时抑制虫草酸消耗基因，从而显著提高虫草酸的积累。

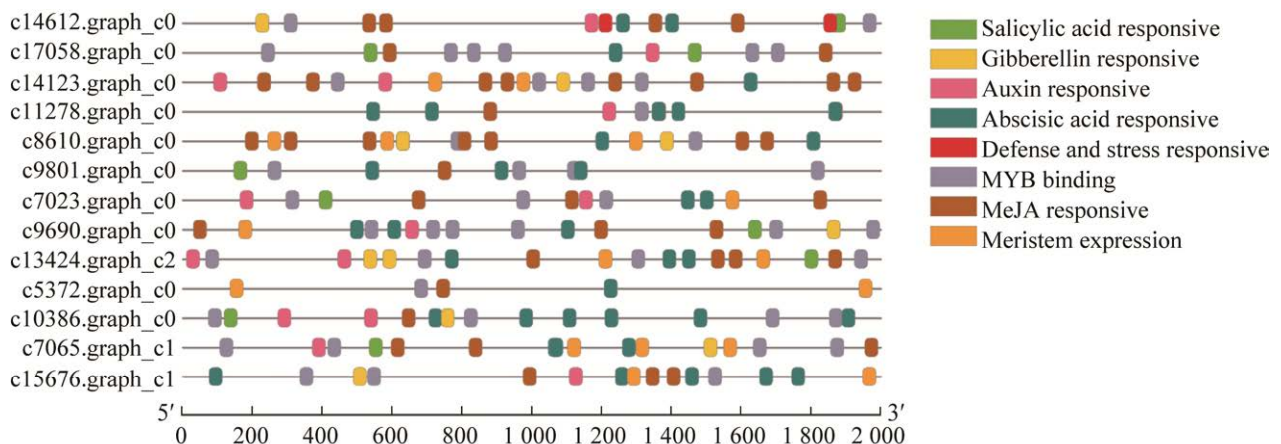


图 7 蝙蝠蛾拟青霉虫草酸代谢途径关键酶基因的启动子分析

Figure 7 Promoters analysis of the key genes in cordyceps acid metabolic pathways.

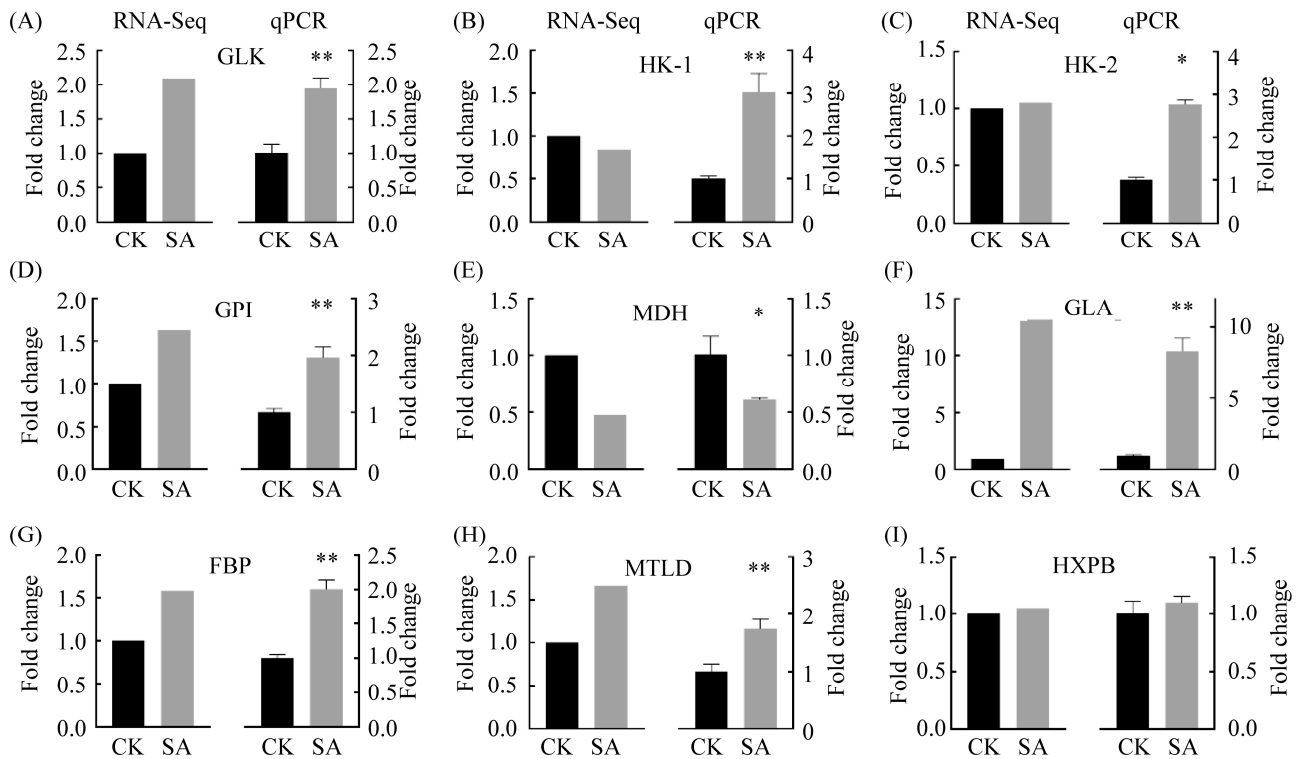


图 8 SA 处理下差异表达基因分析

Figure 8 Validation of DEGs in SA-stressed *Samsoniella hepiali*. RNA-Seq: transcriptome expression; qPCR: quantitative real-time PCR expression; *: represents a significant difference, $P < 0.05$; **: represents an extremely significant difference, $P < 0.01$.

3 讨论

蝙蝠蛾拟青霉作为从冬虫夏草中分离的一种药用真菌, 因其发酵菌丝中含有与野生冬虫夏草相似的活性成分而成为冬虫夏草的人工替代资源。虫草酸作为冬虫夏草中的标志性活性成分之一, 是评价冬虫夏草质量的重要标准。然而, 由于虫草酸含量低、生物代谢途径不明确, 限制了其产量提升及产业化应用。目前转录组测序技术可以有效挖掘中药活性物质生物合成途径和调控网络^[32], 可为虫草酸的有效开发和利用奠定基础。在款冬(*Tussilago farfara* L.)^[33]、全萼秦艽(*Gentiana lhasica* Burk.)^[34] 中利用转录组技术挖掘了萜类生物合成途径的关酶基因, 在桔梗^[35]和黄精^[36]的活性物质生物合成关键酶

基因挖掘中也有报道。近年来, 对冬虫夏草基因组及转录组的研究取得了一定的进展, 通过对不同培养基发酵和不同生长阶段的蝙蝠蛾拟青霉进行转录组分析预测了其虫草素相关的合成基因^[37]; 通过转录组和蛋白质组分析, 比较了人工栽培的冬虫夏草菌丝体和子实体之间的基因表达差异^[38]。但尚缺乏蝙蝠蛾拟青霉虫草酸合成途径及代谢调控方面的研究。然而, 为了提高蝙蝠蛾拟青霉虫草酸的合成量, 必须明确其生物合成途径及代谢调控。

作者在前期研究中发现 SA 诱导显著提高蝙蝠蛾拟青霉中虫草酸的生物合成, 据此推测 SA 诱导可能通过激活蝙蝠蛾拟青霉中虫草酸合成相关基因的表达从而提高其在细胞内的积累。因此本研究利用 SA 诱导下的转录组数据

挖掘蝙蝠蛾拟青霉中虫草酸生物合成途径和代谢调控网络。本研究首次解析了 SA 处理下蝙蝠蛾拟青霉转录组数据,通过对 SA 诱导和未诱导的蝙蝠蛾拟青霉细胞进行高通量测序,共获得 40.37 Gb 的 clean data, 20 317 条 unigene, 平均长度为 1 357.13 bp, 注释共获得 13 592 条 unigene。共筛选出差异基因 2 574 个,其中有 1 135 个上调, 1 439 个下调。我们重点分析了与虫草酸代谢相关的基因,在其上游代谢途径共鉴定出了 *glk*、*hk*、*gpi*、*gla*、*mpi* 和 *fbp* 6 个合成前体物质果糖-6-磷酸的关键酶基因,而在下游代谢途径中挖掘到了 2 个虫草酸合成基因 *mtld* 和 *hxpB* 以及 1 个虫草酸消耗基因 *mdh*。

RNA-Seq 及 qRT-PCR 定量结果一致表明,与虫草酸生物合成相关的基因 *glk*、*gpi*、*gla*、*mpi*、*fbp*、*mtld* 在 SA 处理后表达量上调,涉及虫草酸消耗的基因 *mdh* 在 SA 处理后表达量下调,而作为直接合成虫草酸的关键酶基因 *hxpB* (*c5372.graph_c0*) 无明显变化。我们认为其中一个原因是 *hxpB* 酶活较高,因此其基因表达量及酶合成量低的情况下具备较高的催化活性,这与封志媚的报道一致^[39];另外也可能是由于 *hxpB* 基因启动子中没有水杨酸响应元件,因此其表达不受 SA 的调控。综上所述,SA 诱导能够提高虫草酸合成相关基因的表达同时抑制消耗虫草酸的基因表达,从而提高虫草酸生物合成量。重要的是,我们首次发现 SA 诱导下对半乳糖降解起关键作用的 *gla* 基因显著上调,而半乳糖降解后经过 *hk* 和 *mpi* 的作用可以转化成虫草酸合成的关键前体物质果糖-6-磷酸,从而揭示出蝙蝠蛾拟青霉虫草酸的生物合成存在一条新的补充途径。

此外,通过对虫草酸代谢基因的启动子分析我们发现 *glk* (*c14612.graph_c0*、*17058.graph_c0*)、*gla* (*c9801.graph_c0*)、*mpi*

(*c7023.graph_c0*)、*mtld* (*c13424.graph_c2*)、*fbp* (*c9690.graph_c0*) 和 *mdh* (*c10386.graph_c0*、*7065.graph_c1*) 基因上游启动子区域都存在水杨酸响应元件,表明水杨酸可直接作用于这些基因从而引起虫草酸代谢关键基因表达量的变化。除了水杨酸响应元件外,虫草酸代谢基因的启动子中还可能存在赤霉素、生长素和脱落酸等激素响应元件,参与防御应激响应的作用元件,以及 MYB 转录因子结合位点,这表明 SA 还可能通过调节激素代谢和诱导获得性免疫调控虫草酸的代谢,这与文献报道关于 SA 调控次生代谢产物合成的机制一致^[40-41]。但是目前仍缺乏蛋白水平的实验验证,且蝙蝠蛾拟青霉虫草酸代谢调控网络十分复杂,仍待进一步解析,过表达载体构建、RNA 干扰技术和 CRISPR-Cas9 技术将为日后研究提供更有力的证据。

总之,本研究首次报道了 SA 对蝙蝠蛾拟青霉中虫草酸合成的调控作用,通过 RNA-Seq 技术从构建的转录组文库中获得了高质量的数据,通过对 SA 诱导前后差异基因的比较分析构建了蝙蝠蛾拟青霉虫草酸生物合成途径及 SA 诱导调控网络,并在蝙蝠蛾拟青霉中发现了一条虫草酸合成的新补充途径,解析了 SA 调控虫草酸生物合成的分子机制。不仅如此,本研究还为蝙蝠蛾拟青霉提供了丰富的遗传资源,并将为冬虫夏草物种功能基因组学的研究提供一定的数据支持。

参考文献

- [1] 洪志来, 王文宣, 熊娟, 陈建, 喻立平, 杨国勋, 胡金锋. 蝙蝠蛾拟青霉菌发酵菌丝体的化学成分研究. 中草药, 2013, 44(8): 947-950.
Hong ZL, Wang WX, Xiong J, Chen J, Yu LP, Yang GX, Hu JF. Chemical constituents from fermented mycelium of *Paecilomyces hepiali*. Chinese

- Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(8): 947–950. (in Chinese)
- [2] 戴如琴, 李晓明, 邵爱娟, 林淑芳, 兰江丽, 陈伟华, 沈崇尧. 蝙蝠蛾拟青霉名称的合格化. *菌物学报*, 2008, 27(5): 641–644.
Dai RQ, Li XM, Shao AJ, Lin SF, Lan JL, Chen WH, Shen CY. Nomenclatural validation of *Paecilomyces hepiali*. *Mycosystema*, 2008, 27(5): 641–644. (in Chinese)
- [3] Wang YB, Wang Y, Fan Q, Duan DE, Zhang GD, Dai RQ, Dai YD, Zeng WB, Chen ZH, Li DD, Tang DX, Xu ZH, Sun T, Nguyen TT, Tran NL, Dao VM, Zhang CM, Huang LD, Liu YJ, Zhang XM, Yang DR, Sanjuan T, Liu XZ, Yang ZL, Yu H. Multigene phylogeny of the family *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*): new taxa and the new systematic position of the Chinese cordycipitoid fungus *Paecilomyces hepiali*. *Fungal Diversity*, 2020, 103(1): 1–46.
- [4] 刘俊, 杨本寿, 姜国银. 蝙蝠蛾拟青霉的抑菌活性与菌丝体发酵化学组分的研究. *昆明医科大学学报*, 2012, 33(6): 32–34, 38.
Liu J, Yang BS, Jiang GY. Antibiotic activities and chemical composition of mycelia of a strain *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai. *Journal of Kunming Medical University*, 2012, 33(6): 32–34, 38. (in Chinese)
- [5] 曹阳, 董升, 李博腾, 张淑华, 梁冲, 张国刚. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体化学成分的分离与鉴定(II). *中国药物化学杂志*, 2020, 30(7): 423–427.
Cao Y, Dong S, Li BT, Zhang SH, Liang C, Zhang GG. Isolation and identification of chemical constituents from *Paecilomyces hepiali* Chen et Dai(II). *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 30(7): 423–427. (in Chinese)
- [6] 杨金玲, 肖薇, 何惠霞, 朱慧新, 王淑芳, 程克棣, 朱平. 蝙蝠蛾拟青霉与冬虫夏草关系的分子系统学研究. *药学报*, 2008, 43(4): 421–426.
Yang JL, Xiao W, He HX, Zhu HX, Wang SF, Cheng KD, Zhu P. Molecular phylogenetic analysis of *Paecilomyces hepiali* and *Cordyceps sinensis*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2008, 43(4): 421–426. (in Chinese)
- [7] 曹阳, 张淑华, 梁冲, 李博腾, 董升, 张国刚. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体化学成分研究. *中国药物化学杂志*, 2019, 29(4): 300–304.
Cao Y, Zhang SH, Liang C, Li BT, Dong S, Zhang GG. Study on the chemical constituents of the mycelium of *Paecilomyces hepiali*. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 29(4): 300–304. (in Chinese)
- [8] 陆海峰, 王忠, 吴鸿雪, 王锦锋. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体研究进展. *现代农业科技*, 2020(20): 197–200.
Lu HF, Wang Z, Wu HX, Wang JF. Research progress on mycelium of *Paecilomyces hepialid*. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2020(20): 197–200. (in Chinese)
- [9] 阳丹, 黄婷婷, 陈成, 马云淑. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体研究现状. *中国中医药信息杂志*, 2015, 22(5): 129–131.
Yang D, Huang TT, Chen C, Ma YS. Research status on *Paecilomyces hepialid*. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2015, 22(5): 129–131. (in Chinese)
- [10] Lee SJ, Kim SK, Choi WS, Kim WJ, Moon SK. Cordycepin causes p21WAF1-mediated G2/M cell-cycle arrest by regulating c-Jun N-terminal kinase activation in human bladder cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009, 490(2): 103–109.
- [11] Chen PX, Wang SN, Nie SP, Marcone M. Properties of *Cordyceps sinensis*: a review. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(2): 550–569.
- [12] Xiang M, Tang J, Zou XL, Zhao ZY, Wang YY, Xie SN. Beta cell protecting and immunomodulatory activities of *Paecilomyces Hepiali* Chen mycelium in STZ induced T1DM mice. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2009, 37(2): 361–372.
- [13] Chatterjee R, Srinivasan KS, Maiti PC. *Cordyceps sinensis* (Berkeley) saccardo: structure of cordycepic acid. *Journal of the American Pharmaceutical Association: Scientific Ed*, 1957, 46(2): 114–118.
- [14] Sprecher M, Sprinson DB. A reinvestigation of the structure of “cordycepic acid” 1a. *The Journal of Organic Chemistry*, 1963, 28(9): 2490–2491.
- [15] 欧阳阳阳, 张哲, 曹忆嵘, 张原青, 陶艳艳, 刘成海, 徐列明, 郭津生. 虫草酸和虫草素对肝星状细胞炎症及纤维化发生特性的影响. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(4): 275–278.
Ouyang YY, Zhang Z, Cao YR, Zhang YQ, Tao YY, Liu HC, Xu LM, Guo JS. Effect of cordyceps acid and cordycepin on the inflammatory and fibrogenic response of hepatic stellate cells. *Chinese Journal of Hepatology*, 2013, 21(4): 275–278. (in Chinese)
- [16] Liu ZQ, Lin S, Baker PJ, Wu LF, Wang XR, Wu H, Xu F, Wang HY, Brathwaite ME, Zheng YG. Transcriptome sequencing and analysis of the

- entomopathogenic fungus *Hirsutella sinensis* isolated from *Ophiocordyceps sinensis*. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 106.
- [17] Jin LQ, Xu ZW, Zhang B, Yi M, Weng CY, Lin S, Wu H, Qin XT, Xu F, Teng Y, Yuan SJ, Liu ZQ, Zheng YG. Genome sequencing and analysis of fungus *Hirsutella sinensis* isolated from *Ophiocordyceps sinensis*. *AMB Express*, 2020, 10(1): 105.
- [18] 全晶晶. 两种培养条件下蛹虫草代谢成分及其转录调控比较研究. 云南大学硕士学位论文, 2018.
- [19] Yu Y, Wang WT, Wang LP, Pang F, Guo LP, Song L, Liu GM, Feng CQ. Draft genome sequence of *Paecilomyces hepiali*, isolated from *Cordyceps sinensis*. *Genome Announcements*, 2016, 4(4): e00606–e00616.
- [20] 宋利璞. 药用植物金银花及药用真菌蝙蝠蛾拟青霉的转录组学研究. 中国科学院北京基因组研究所博士学位论文, 2014.
- [21] Dong JE, Wan GW, Liang ZS. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology*, 2010, 148(2/3): 99–104.
- [22] Hao X, Shi M, Cui L, Xu C, Zhang Y, Kai G. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015, 62(1): 24–31.
- [23] Roy A, Bharadvaja N. Establishment of root suspension culture of *Plumbago zeylanica* and enhanced production of Plumbagin. *Industrial Crops and Products*. 2019, 137: 419–427.
- [24] Tajik S, Zarinkamar F, Soltani BM, Nazari M. Induction of phenolic and flavonoid compounds in leaves of saffron (*Crocus sativus* L.) by salicylic acid. *Scientia Horticulturae* 2019, 257(17): 108751.
- [25] Pu GB, Ma DM, Chen JL, Ma LQ, Wang H, Li GF, Ye HC, Liu BY. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(7): 1127–1135.
- [26] Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng QD, Chen ZH, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644–652.
- [27] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [28] 魏文婷. 产甘露醇菌株的筛选及其生物合成的研究. 江南大学硕士学位论文, 2014.
- [29] Lin S, Liu ZQ, Xue YP, Baker PJ, Wu H, Xu F, Teng Y, Brathwaite ME, Zheng YG. Biosynthetic pathway analysis for improving the cordycepin and cordycepic acid production in *Hirsutella sinensis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 179(4): 633–649.
- [30] 王晓瑞. 中国被毛孢活性物质合成途径的分析、验证与调控. 浙江工业大学硕士学位论文, 2015.
- [31] Chi S, Wang GL, Liu T, Wang XM, Liu C, Jin YM, Yin HX, Xu X, Yu J. Transcriptomic and proteomic analysis of mannitol-metabolism-associated genes in *Saccharina japonica*. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2020, 18(4): 415–429.
- [32] 夏樱霞, 谢放, 苏强军, 李佳莹, 陈照禾, 周刚. 转录组测序技术在食药菌研究中的应用. *现代食品*, 2020(24): 31–33.
Xia YX, Xie F, Su QJ, Li JY, Chen ZH, Zhou G. Application of transcriptome sequencing technology in study of edible and medicinal fungi. *Modern Food*, 2020(24): 31–33. (in Chinese)
- [33] 贺润丽, 王晓英, 韩毅丽, 刘计权, 杜晨晖, 王莉花. 利用转录组分析款冬萜类化合物生物合成关键酶基因及表达特征. *中草药*, 2020, 51(20): 5302–5310.
He RL, Wang XY, Han YL, Liu JQ, Du CH, Wang LH. Analysis of key genes and their expression characteristics related to terpenoid biosynthesis in *Tussilago farfara* based on transcriptome sequencing. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(20): 5302–5310. (in Chinese)
- [34] 康恒, 赵志礼, 倪梁红, 李尉涛, 赵淑娟, 刘铜华. 全萆秦艽转录组中环烯醚萜类相关基因挖掘及验证. *中国中药杂志*, 2021, 46(18): 4704–4711.
Kang H, Zhao ZL, Ni LH, Li WT, Zhao SJ, Liu TH. Transcriptome analysis and validation of key genes involved in biosynthesis of iridoids in *Gentiana lhasica*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, 46(18): 4704–4711. (in Chinese)
- [35] 张健, 潘媛, 王钰, 陈大霞. 不同年份桔梗转录组学分析及桔梗皂苷生物合成关键基因挖掘. *中国中药杂志*, 2021, 46(6): 1386–1392.
Zhang J, Pan Y, Wang Y, Chen DX. Transcriptome analysis of *Platycodon grandiflorum* at different

- growth years and discovery of key genes for platycodin biosynthesis. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, 46(6): 1386–1392. (in Chinese)
- [36] 祝明珠, 俞年军, 王秋丽, 周安, 顾晓, 韩荣春, 童小慧, 彭代银. 基于多花黄精转录组的多糖及薯蓣皂苷生物合成路径研究. *中国中药杂志*, 2020, 45(1): 85–91.
Zhu MZ, Yu NJ, Wang QL, Zhou A, Gu X, Han RC, Tong XH, Peng DY. Biosynthetic pathways of *Polygonatum cyrtonema* polysaccharide and diosgenin based on its transcriptomic data. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(1): 85–91. (in Chinese)
- [37] Pang F, Wang LP, Jin Y, Guo LP, Song LP, Liu GM, Feng CQ. Transcriptome analysis of *Paecilomyces hepiali* at different growth stages and culture additives to reveal putative genes in cordycepin biosynthesis. *Genomics*, 2018, 110(3): 162–170.
- [38] Yin YL, Yu GJ, Chen YJ, Jiang S, Wang M, Jin YX, Lan XQ, Liang Y, Sun H. Genome-wide transcriptome and proteome analysis on different developmental stages of *Cordyceps militaris*. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51853.
- [39] 封志媚. D-甘露醇在大肠杆菌中合成与分解相关酶及途径的研究. 天津科技大学硕士学位论文, 2017.
- [40] 齐敏杰, 梁娥, 张来. 诱导子在药用植物毛状根生产次生代谢产物中的作用机理与应用. *生物学杂志*, 2020, 37(5): 99–102.
Qi MJ, Liang E, Zhang L. Mechanism and application of elicitors in the production of secondary metabolites from hairy roots of medicinal plants. *Journal of Biology*, 2020, 37(5): 99–102. (in Chinese)
- [41] 王铭, 宋跃, 安慧, 庞秋颖, 阎秀峰. 外源诱导子影响植物悬浮细胞次生代谢产物积累的研究进展. *植物生理学报*, 2021, 57(4): 739–748.
Wang M, Song Y, An H, Pang QY, Yan XF. Research progress on the effect of exogenous elicitors on the accumulation of secondary metabolites in plant suspension cells. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(4): 739–748. (in Chinese)