



研究报告

广东虫草邻氨基苯甲酸合酶基因克隆及不同实验条件下的表达

李敏^{1,2} 王刚正² 邓旺秋² 张成花² 高宇^{2,3} 旺姆^{*1} 李泰辉^{*2}

1 西藏农牧学院食品科学学院 西藏 林芝 860000

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室
广东 广州 510070

3 湖南农业大学生物科学技术学院 湖南 长沙 410128

摘要:【背景】邻氨基苯甲酸合酶(TrpE)广泛存在于植物和微生物中,参与色氨酸和生长素的生物合成,在生长发育及胁迫响应过程中具有重要的作用。广东虫草(*Tolypocladium guangdongense*)是华南地区特有的一种极具开发价值的虫草资源。【目的】明确 *TgtrpE* 基因特征,并探究该基因在不同发育时期和不同温度下的表达模式。【方法】从广东虫草中克隆 *TgtrpE* 编码区序列,并进行生物信息分析和系统发育分析,采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)分析 *TgtrpE* 在广东虫草中不同发育时期及温度胁迫下的表达模式。【结果】*TgtrpE* 编码区序列长度为 1 613 bp (DNA)和 1 563 bp (cDNA),编码 521 个氨基酸,预测其蛋白分子量约为 56.86 kD。系统发育分析显示, *TgTrpE* 蛋白与子囊菌中的 TrpE 蛋白聚为一个分支,与奇异弯颈霉(*Tolypocladium paradoxum*)和头状弯颈霉(*Tolypocladium capitatum*)具有较高的相似性。RT-qPCR 结果表明:在广东虫草原基和幼嫩子实体的发育过程中, *TgtrpE* 显著上调,而在成熟子实体期该基因显著下调;在温度胁迫过程中, *TgtrpE* 显著下调表达。【结论】*TgtrpE* 可能在广东虫草原基形成、子实体发育及温度胁迫响应过程中具有重要调控作用。

关键词: TA 克隆, 生长发育, 温度胁迫, 差异表达

Foundation items: Special Fund of Guangdong Academy of Sciences (2020GDASYL-20200103014); National Natural Science Foundation of China (31900015, 31800012); Guangzhou Science and Technology Project (201804020018)

***Corresponding authors:** E-mail: WANG Mu: wangmutb@163.com; LI Taihui: mycolab@263.net

Received: 18-09-2020; **Accepted:** 23-10-2020; **Published online:** 24-12-2020

基金项目: 广东省科学院专项基金(2020GDASYL-20200103014); 国家自然科学基金(31900015, 31800012); 广州市科技计划重点项目(201804020018)

***通信作者:** E-mail: 旺姆: wangmutb@163.com; 李泰辉: mycolab@263.net

收稿日期: 2020-09-18; **接受日期:** 2020-10-23; **网络首发日期:** 2020-12-24

Clone and expression of anthranilate synthase gene from *Tolypocladium guangdongense* under differential experimental conditions

LI Min^{1,2} WANG Gangzheng² DENG Wangqiu² ZHANG Chenghua² GAO Yu^{2,3}
WANG Mu^{*1} LI Taihui^{*2}

1 Food Science College, Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi, Tibet 860000, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application; State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China; Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510070, China

3 College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410128, China

Abstract: [Background] Anthranilate synthase, one common enzyme in plants and microbes, is involved in the biosynthesis of tryptophan and auxin, and plays an important role in growth and development, together with the response to multiple stresses. *Tolypocladium guangdongense* is a new cordyceps resource only found in South China, and has a great exploitation value. [Objective] Dissect the gene features of *TgtrpE*, and explore the expression pattern of *TgtrpE* at differential developmental stages and temperature stress conditions in *T. guangdongense*. [Methods] The coding sequences of *TgtrpE* were cloned from *T. guangdongense* and used for bioinformatic and phylogenetic analysis. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to analyze the expression pattern of *TgtrpE* under differential developmental stages and temperature stresses. [Results] The sizes of *TgtrpE* were 1 613 bp (DNA) and 1 563 bp (cDNA) in length, respectively. It encodes 521 amino acids with a molecular weight approximate of 56.86 kD. The phylogeny result showed that the TgTrpE protein of *T. guangdongense* was clustered into one clade with those of ascomycetes fungi, and had a higher similarity with *Tolypocladium paradoxum* and *Tolypocladium capitatum*. RT-qPCR results showed that compared to the mycelial stage, *TgtrpE* was significantly up-regulated at primordium and young fruiting body stages, whereas *TgtrpE* showed a clear downregulation expression at mature fruiting body stage and in the response process of cold and heat stresses. [Conclusion] *TgtrpE* may play an important role in the processes of primordium formation, fruiting body development and temperature stresses.

Keywords: TA clone, growth and development, temperature stress, differential expression

广东虫草(*Tolypocladium guangdongense*)是作者所在研究团队 2005 年于广东地区发现的一种食药真菌, 是华南地区特有的一种珍贵虫草资源^[1], 含有与冬虫夏草相似的腺苷、虫草酸、虫草多糖等活性物质^[2-3], 具有抗流感^[4]、保肝护肾^[5]、抗疲劳抗衰老^[6]等功效, 其菌丝抗逆性好, 能适应 17-32 °C 的生长温度区间^[7], 经驯化后已实现子实体的人工栽培^[8] (图 1)。

邻氨基苯甲酸合酶基因(*trpE*)存在于绝大部分植物和微生物中, 其表达的邻氨基苯甲酸合酶是色氨酸生物合成过程的限速酶, 与生长发育、抗逆等多个调控过程息息相关^[9-13]。研究发现, *trpE*

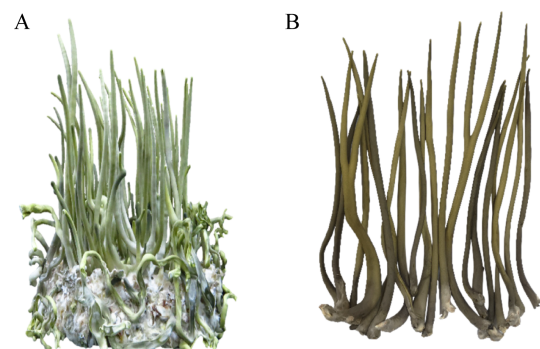


图 1 发育中的广东虫草子实体(A)和成熟后的广东虫草子实体(B)

Figure 1 The developing fruiting body of *Tolypocladium guangdongense* (A) and mature fruiting body of *Tolypocladium guangdongense* (B)

通过调控色氨酸的代谢来影响酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 对酒精的耐受力^[14]。马超君等克隆了与 *trpE* 同源的担子菌香菇(*Lentinula edodes*) *LetrpE* 基因, 利用 RNAi 技术构建转化子, 采用农杆菌介导转化法侵染香菇菌丝, 结果表明, *LetrpE* 基因与香菇菌丝的耐热性有关^[15]。Wang 等证实, 在热胁迫过程中, 香菇中的 LeDnaJ 与 LeTrpE 相互作用, 通过调控生长素的合成介导香菇菌丝的耐热性^[16]。基于多组学分析, 作者所在研究团队鉴定了广东虫草中色氨酸和生长素生物合成相关酶基因^[9] (图 2)。然而, *TrpE* 基因结构特征、不同实验条件表达模式及功能在子囊菌, 特别是虫草类真菌中尚未有详细的报道。因此, 对广东虫草中 *TgtrpE* 进行克隆并分析其不同条件下的表达水平具有重要的意义。

本研究通过克隆得到了 *TgtrpE* 基因的编码区, 并对该基因结构进行分析, 预测其编码蛋白, 分析其系统发育关系, 以及探讨 *TgtrpE* 在不同发育时期和温度胁迫下的表达规律, 以期后续从分子水平解析 *TgtrpE* 表达调控模式及具体功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

广东虫草菌株(GDGM30035)由广东省微生物研究所华南微生物资源中心提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

Trizol 试剂盒、PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、Mighty TA-Cloning Reagent Set for PrimeSTAR[®] 试剂盒、*Escherichia coli* DH5α Competent Cells 和 DNA Marker, TaKaRa 公司; PrimeSTAR HS DNA Polymerase, Thermo Scientific 公司; AceQTM qPCR SYBR Green Master Mix, Vazyme 公司; 真菌 DNA 小量提取试剂盒, 广州美基生物科技有限公司; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 引物合成和基因测序交由北京六合华大科技有限公司广州分公司完成。

PCR 仪, Eppendorf 公司; QuantStudio 6 Flex 实时荧光定量 PCR 系统, Thermo Scientific 公司; 全自动样品快速研磨仪, 上海净信实业发展有限公司。

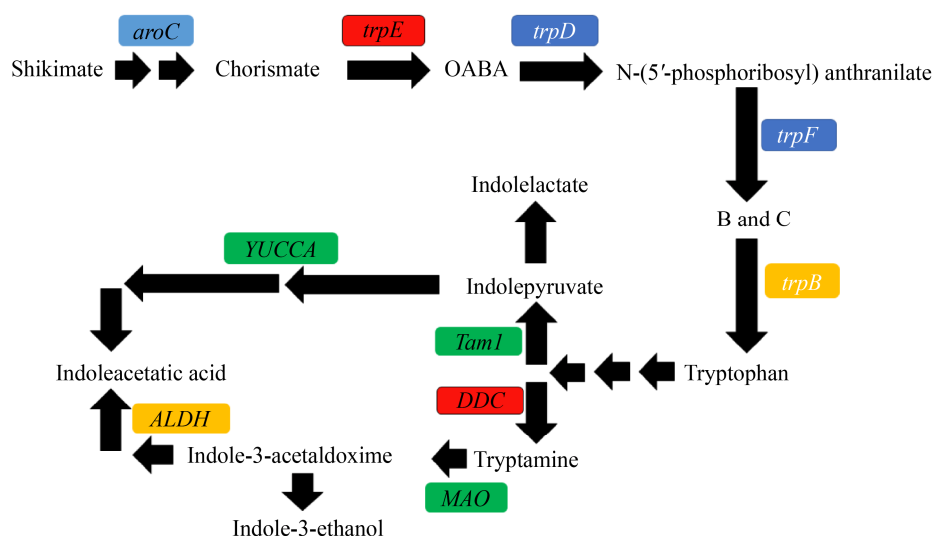


图 2 广东虫草中色氨酸和生长素生物合成途径^[9]

Figure 2 Biosynthesis pathway of tryptophan and IAA in *T. guangdongense*^[9]

1.1.3 培养基

改良完全培养基(Improved Complete Yeast Medium, CYM): 葡萄糖 20.0 g/L, 酵母提取物 2.0 g/L, 胰蛋白胨 2.0 g/L, 七水硫酸镁 0.46 g/L, 磷酸氢二钾 0.5 g/L, 磷酸二氢钾 1.0 g/L, 维生素 B₁ 0.1 g/L。米饭培养基: 大米 20 g, 营养液 25 mL。培养基均 103.4 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

收取适量的广东虫草菌丝体, 立即加入液氮冷冻, 组织研磨机充分研磨, 使用 Trizol 法提取总 RNA, 并用 NanoDrop One 检测质量, 于-20 °C 保存。

参照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)说明书进行反转录, 得到 cDNA 第一条链, 于-20 °C 保存。

1.3 基因组 DNA 提取

参照真菌 DNA 小量提取试剂盒的说明书对广东虫草菌丝基因组 DNA 进行提取, 用 NanoDrop One 检测质量, 于-20 °C 保存。

1.4 *TgtrpE* 的克隆

从广东虫草基因组中获得 *TgtrpE* 并设计其上、下游序列信息^[17], 利用 Primer 5.0 软件设计引物 *trpE*-F 和 *trpE*-R (表 1)。

以广东虫草 DNA 为模板, 利用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 进行 *TgtrpE* 片段的 PCR 扩增^[9], PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 40 s, 58 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 35 次循环; 72 °C 10 min。扩增后的 PCR 产物进行电泳检测及回收。

以广东虫草 cDNA 为模板, 利用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 进行 *TgtrpE* 片段的 PCR 扩增^[9], PCR 反应条件同上, 扩增后的 PCR 产物进行电泳检测及回收。

将回收的 PCR 产物连入 pMD20-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。

1.5 *TgtrpE* 生物信息学分析

利用在线软件 GSDS 进行基因结构组成分析; 借助在线软件 ExPASy 对等电点以及分子量进行预测分析^[18]; 采用在线软件 TMHMM 进行蛋白质的跨膜区预测分析; 通过在线软件 SignalP 5.0 对信号肽进行预测分析; 运用在线软件 PredictProtein 和 Phyre2 进行蛋白二级结构预测分析; 从 NCBI 数据库中下载已报道的具代表性的 *TrpE* 氨基酸序列, 在 EMBL-EBI 网站上进行多序列比对, 并用软件 MEGA 7.0 的最大似然法(Maximum Likelihood, ML) 构建系统发育树^[19]。

1.6 *TgtrpE* 启动子分析

从广东虫草基因组数据库中获得 *TgtrpE* 上游区域(1.5 kb)序列, 在线搜索该区域顺式作用调控元件的种类和数量(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[20]。

1.7 *TgtrpE* 在不同条件下的表达分析

将广东虫草液体发酵菌球接种至 CYM 培养基上, 避光培养 20 d 后收集广东虫草在菌丝期(Mycelia)的菌丝样品, 随后模拟自然光照(10 h 光照、14 h 黑暗)继续培养, 收集原基形成期(Primordia, 长度约 6 mm)、幼子实体期(Young Fruiting Bodies, 长度约 1–2 cm)、成熟期(Mature Fruiting Bodies, 长度大于 5 cm 且呈深绿色)及冷、热胁迫下(17 °C 和 30 °C 处理 24 h)的菌丝和子实体样品^[21], 立即液氮冷冻, 于-80 °C 保存。同 1.2 提取 RNA, 并反转录成 cDNA。采用 AceQ™ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme)在 QuantStudio 6 Flex 实时荧光定量 PCR 系统上进行 RT-qPCR, 检测 *TgtrpE* 在广东虫草不同发育时期和不同温度处

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primers sequence (5'→3')
<i>trpE</i> -F	ATGGTCCCGTCGCTCGAG
<i>trpE</i> -R	CTATTGCGCCGCCTTGGCC
<i>qtrpE</i> -F	CGTACCTCTTCTACGTCAACTG
<i>qtrpE</i> -R	AACCTTCTCGACGACCATGAG
<i>H4</i> -F	GTGACAACATCCAGGGTATC
<i>H4</i> -R	TCGAGGAAGGTCTTGAGAA

理下的相对表达量。以 *Histone4* (*H4*)作为内参基因(表 1), RT-qPCR 反应体系和反应条件参照文献[21]。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算该基因的相对表达量并作图。

2 结果与分析

2.1 *TgtrpE* 克隆

以广东虫草 DNA 和 cDNA 为模板, 用特异性引物扩增 *TgtrpE* 的全长和编码序列(Coding Sequence, CDS)并克隆。1%凝胶电泳结果显示, DNA(图 3A)和 cDNA(图 3B)的菌落 PCR 扩增产物长度约为 1 500 bp, 与预期大小一致。测序结果显示, DNA 和 cDNA 的 PCR 扩增产物长度分别为 1 613 bp 和 1 563 bp, 与参考序列完全匹配, *TgtrpE* 的 CDS 克隆成功, 该基因有一个内含子, 长度为 61 bp(图 4A)。

2.2 生物信息学分析

通过蛋白一级结构预测表明 *TgtrpE* 的 CDS 编码 521 个氨基酸, 蛋白分子量大小为 56.86 kD, 等电点为 5.80。蛋白结构分析表明, 其具有一个保守的 Anth_synt_I_N 结构域(邻氨基苯甲酸合酶保守结构域)和一个保守的 Chorismate_bind 结构域, 分别属于 Anth_synt_I_N superfamily 和 Chorismate_bind

superfamily(图 4A)。二级结构预测结果显示, 该蛋白含有 24 个 α 螺旋和 45 个 β 折叠。跨膜结构域预测结果显示, 该蛋白不具有跨膜结构域(图 4B)。信号肽预测结果显示, 该蛋白上无信号肽(图 4C)。

2.3 *TgTrpE* 蛋白系统发育分析

系统发育树中展示了广东虫草与其他物种来源 TrpE 蛋白间的亲缘关系, 大体分成了真菌、植物和细菌 3 个分支, 真菌分支下分为子囊菌和担子菌 2 个分支(图 5A)。广东虫草属于子囊菌分支, 与奇异弯颈霉(*Tolypocladium paradoxum*)和头状弯颈霉(*Tolypocladium capitatum*)、罗伯茨绿僵菌(*Metarhizium robertsii*)亲缘关系最近, 序列一致性分别为 94.75%、90.57%和 91.83%; 与蛹虫草(*Cordyceps militaris*)和尖顶羊肚菌(*Morchella conica*)关系次之, 分别具有 85.03%和 74.08%的序列一致性。广东虫草与大肠杆菌(*Escherichia coli*)亲缘关系最远, 序列一致性为 43.83%, 其次是植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 两者的序列一致性为 45.90%。就邻氨基苯甲酸合酶保守结构域(127 个氨基酸)而言(图 5B), 其与头状弯颈霉、奇异弯颈霉仅有 2 个和 3 个氨基酸的差异, 与罗伯茨绿僵菌有 11 个氨基酸不同。

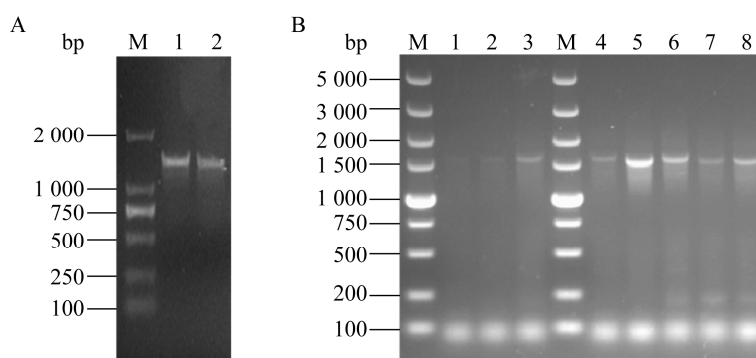


图 3 琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 3 Analysis of agarose gel electrophoresis

注: A: DNA 为模板进行扩增; B: cDNA 为模板进行扩增。M: DNA Marker; 1-3: *TgtrpE* (DNA)阳性克隆菌落; 4-8: *TgtrpE* (cDNA)阳性克隆菌落

Note: A: Amplification using DNA as template; B: Amplification using cDNA as template. M: DNA Marker; 1-3: *TgtrpE* (DNA) positive colony; 4-8: *TgtrpE* (cDNA) positive colony

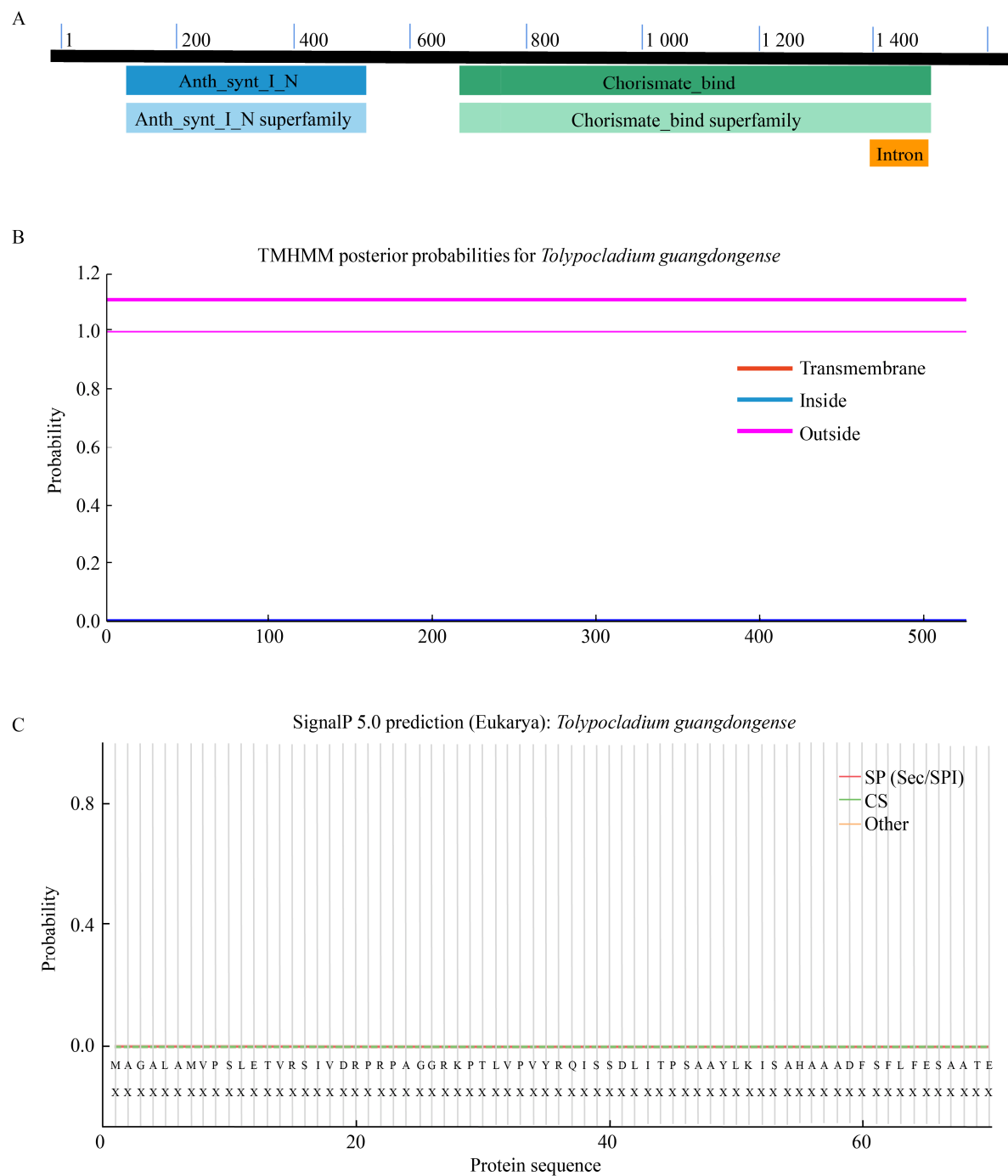


图 4 TgTrpE 氨基酸序列生物信息分析

Figure 4 Bioinformatic analysis of TgTrpE amino acid sequence

注：A：氨基酸序列的保守结构域分析；B：蛋白跨膜结构域预测；C：信号肽预测。Anth_synt_I_N：邻氨基苯甲酸合酶氮端

Note: A: Conservative domain analysis of amino acid sequence; B: Prediction of protein transmembrane domain; C: Signal peptide prediction. Anth_synt_I_N: N-terminal of anthranilate synthase

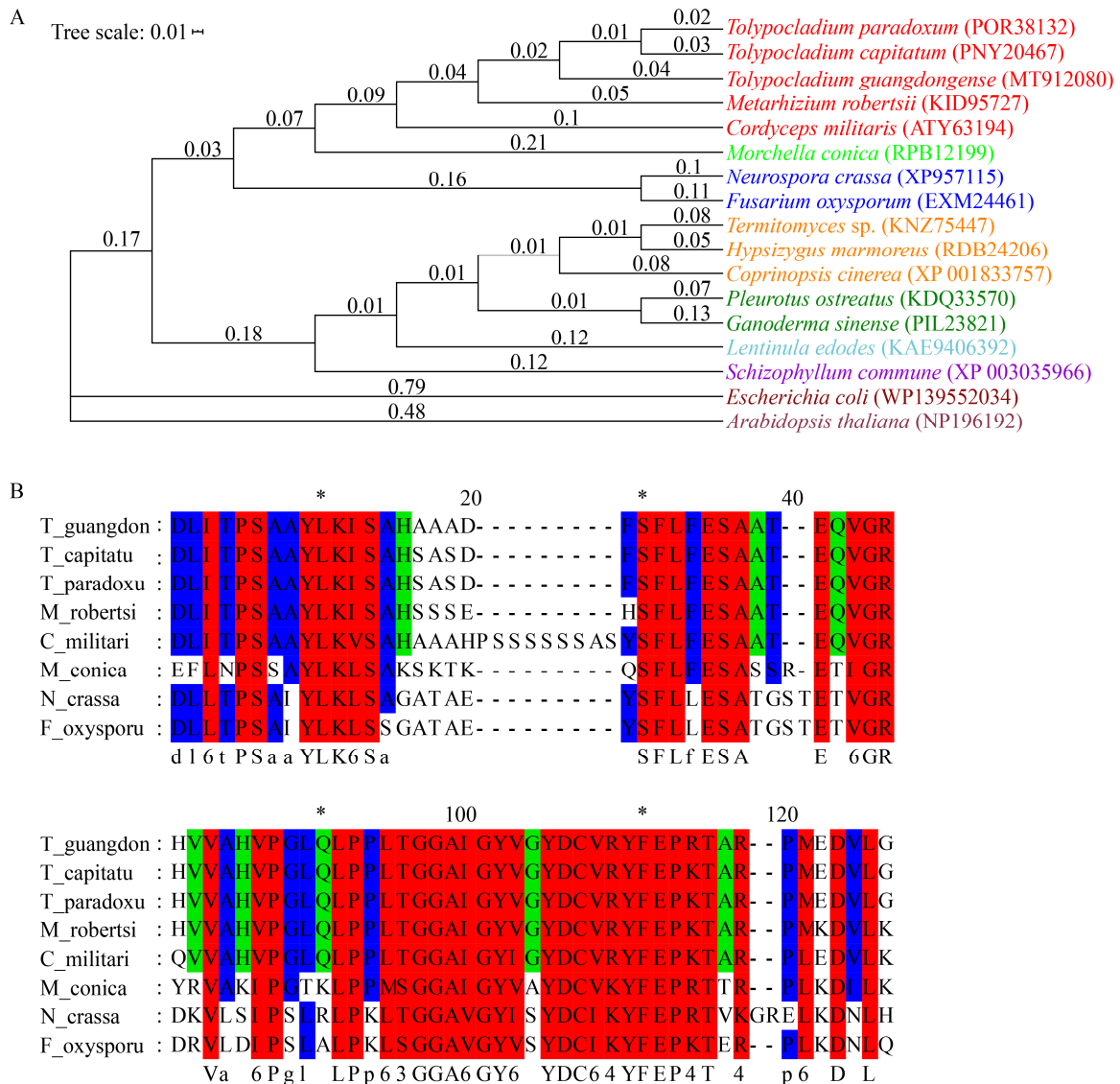


图 5 TgTrpE 系统进化树分析(A)及同源氨基酸序列比对(B)

Figure 5 Phylogenetic tree analysis (A) and homologous amino acid sequence alignment (B) of TrpE in *Tolypocladium guangdongense*

注: 进化树上数值为该分支长度, 表示进化距离。T_guangdon: 广东虫草; T_capitatu: 头状虫草; T_paradoxu: 反常托波克雷氏菌; M_robertsi: 罗伯茨绿僵菌; C_militari: 蛹虫草; M_conica: 尖顶羊肚菌; N_crassa: 粗糙脉胞霉; F_oxysporu: 尖孢镰刀菌

Note: The value on the phylogenetic tree is the branch length, which represents evolutionary distance. T_guangdon: *T. guangdongense*; T_capitatu: *T. capitatum*; T_paradoxu: *T. paradoxum*; M_robertsi: *Metarhizium robertsii*; C_militari: *C. militaris*; M_conica: *Morchella conica*; N_crassa: *Neurospora crassa*; F_oxysporu: *Fusarium oxysporum*

2.4 TgtrpE 启动子顺式作用元件分析

分析结果显示, *TgtrpE* 启动子顺式作用元件包括对环境因子响应和对植物激素响应 2 部分: 环境因子包括光照、干旱和胁迫等; 植物激素包括茉莉酸甲酯(MeJA)、赤霉素(GA)、脱落酸

(ABA)、生长素(IAA)等。在植物中, *trpE* 基因的功能与病原菌侵染、温度、盐度、激素等相关联。*TgtrpE* 启动子区域存在多个响应胁迫的顺式作用元件(表 2), 共 8 种类型, 包括环境胁迫相关的光照、干旱、胁迫抵御、节律调控

表 2 *TgtrpE* 启动子区的顺式作用元件
Table 2 *Cis-acting elements in the promoter region of TgtrpE in T. guangdongense*

Element name	Core sequence	Position (bp)	Number	Function
ABRE	ACGTG	-149, -170, -321, -468	4	<i>Cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ACE	GCGACGTACC	-146	1	<i>Cis</i> -acting element involved in light responsiveness
CAAT-box	CAAAT	-974, -919, -920, -1 442	4	Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
CCGTCC motif	CCGTCC	-1355, -898	2	<i>Cis</i> -acting element of methyl jasmonate responsiveness
CGTCA motif	CGTCA	-823	1	<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
DRE core	GCCGAC	-374	1	<i>Cis</i> -acting elements involved in drought responsiveness
G-box	CACGTC	-1 126	1	<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
Sp1	GGGCGG	-488, -89	2	Light responsive element
TGA-element	AACGAC	-464	1	Auxin-responsive element
TGACG-motif	TGACG	-1 468, -785	2	<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
MYB	CAACCA	-352	1	Unknow
MYB recognition site	CCGTTG	-692	1	Unknow
OCT	CGCGGATC	-269	1	Unknow
STRE	AGGGG	-71, -1 097, -534	3	Unknow
Box s	AGCCACC	-774, -815	2	Unknow

和植物激素相关的脱落酸、赤霉素、茉莉酸甲酯、生长素响应顺式作用元件。其中，检测到光照响应元件4个，干旱响应元件1个，胁迫抵御响应元件1个，节律调控响应元件1个，脱落酸响应元件4个，MYB 转录因子响应元件1个，茉莉酸甲酯响应元件3个，生长素响应元件1个。

2.5 *TgtrpE* 不同发育时期和温度下的表达分析

以 *TgtrpE* 在菌丝期(M)的表达量为对照，随着生长发育过程的推进，*TgtrpE* 的表达量呈现先上调后下调的走势；在原基期(P)和幼子实体期(YFB)，*TgtrpE* 的表达量逐步上调，表现为正调控；在成熟子实体期(MFB)，其表达量显著下调，表现为负调控。

以最适温度 23 °C 下 *TgtrpE* 在菌丝期(M)的表达量为对照，对广东虫草菌丝施以冷胁迫 17 °C (CT)和热胁迫 30 °C (HT)，*TgtrpE* 的表达量均明显下调，表明 *TgtrpE* 的表达与冷热胁迫响应这一过程呈负反馈调控(图 6)。

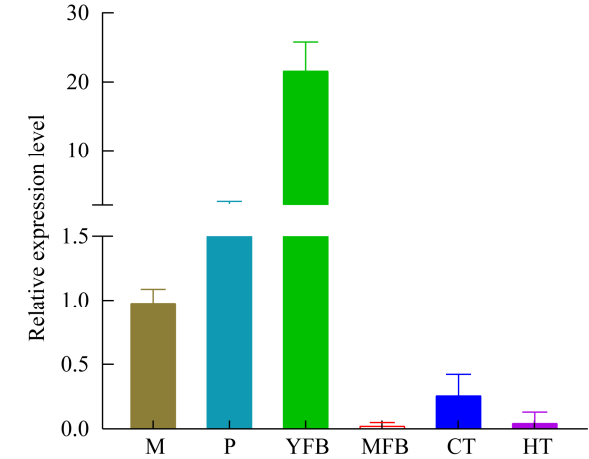


图 6 *TgtrpE* 在广东虫草不同发育时期及温度胁迫下的表达分析

Figure 6 Relative expression levels of *TgtrpE* at different developmental stages and stress in *T. guangdongense*

注：M：菌丝期；P：原基期；YFB：幼子实体期；MFB：成熟子实体期；CT：冷胁迫；HT：热胁迫

Note: M: Mycelial stage; P: Primordial stage; YFB: Young fruiting body stage; MFB: Mature fruiting body stage; CT: Cold temperature; HT: Heat temperature

3 讨论与结论

真菌菌丝的生长、发育及胁迫抵御是一个复杂的动态过程,需要碳氮源、水、维生素、矿质元素和激素等物质的参与^[22],而这些物质的吸收利用需要一系列蛋白质和酶的协助,在此过程中会涉及多种影响与调控机制。

邻氨基苯甲酸合酶广泛地存在于植物、微生物等生物体中,并且参与到其生长、发育、和抗性调节等过程中,是合成色氨酸、生长素等下游代谢物的限速酶^[15]。在水稻植株上的实验结果表明,超量表达 *OAS1D* 与野生型相比产生了更多的邻氨基苯甲酸和色胺等代谢产物^[23]。在植株中对邻氨基苯甲酸合酶进行超量表达,结果显示与芳香族的氨基酸和茉莉酸有关的代谢通路上的基因发生了显著的变化^[24]。在广东虫草子实体发育的不同时期, *TgtrpE* 存在差异表达,同时,与常规温度条件相比,在不同的温度胁迫条件下 *TgtrpE* 下调表达。这与香菇中 *LetrpE* 在高温胁迫过程的表达模式相似,而且香菇中 *LetrpE* 沉默降低了香菇的耐热能力^[15,25]。由此可预测, *TgtrpE* 的表达与广东虫草生长发育过程和胁迫抵御过程存在关联。

本研究结果表明, *TgtrpE* 参与了广东虫草的生长发育和胁迫抵御过程,但对其调控广东虫草生长发育和胁迫抵御过程的具体途径和机制尚不清楚,亟待深入研究。后续研究将聚焦于采用基因沉默和超表达技术获得转化子,检测转化子菌丝生长情况以及对不同胁迫下的抗性变化,并通过代谢组学比较不同时期和不同胁迫下的代谢产物差异,进而分析 *TgtrpE* 调控广东虫草生长发育、胁迫抗性及其代谢成分合成的分子机制。

REFERENCES

- [1] Lin QY, Li TH, Song B. *Cordyceps guangdongensis* sp. nov. from China[J]. Mycotaxon, 2008, 103: 371-376
- [2] Lin QY, Li TH, Song B, Huang H. Comparison of selected chemical component levels in *Cordyceps guangdongensis*, *C. sinensis* and *C. militaris*[J]. Acta Edulis Fungi, 2009, 16(4): 54-57 (in Chinese)
- [3] Lin QY, Li T, Song B, Li TH. Studies on submerged culture and chemical components of *Cordyceps guangdongensis* mycelial[J]. Food Research and Development, 2014, 35(3): 85-87 (in Chinese)
- [4] Yan WJ, Li TH, Jiang ZD. Antiviral activity of *Cordyceps guangdongensis* against influenza virus infections in mice[J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(3): 64-66 (in Chinese)
- [5] Yan WJ, Jiang ZD, Li TH. Therapeutic effects of *Cordyceps guangdongensis* on chronic renal failure rats induced by adenine[J]. Mycosystema, 2012, 31(3): 432-442
- [6] Yan WJ, Li TH, Lao JH, Song B, Shen YH. Anti-fatigue property of *Cordyceps guangdongensis* and the underlying mechanisms[J]. Pharmaceutical Biology, 2013, 51(5): 614-620
- [7] Lin QY, Li TH, Huang H, Song B. Studies on light and temperature conditions for cultivation of *Cordyceps guangdongensis*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2009, 30(1): 42-45 (in Chinese)
- [8] Lin QY, Song B, Huang H, Li TH. Optimization of selected cultivation parameters for *Cordyceps guangdongensis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(2): 219-225
- [9] Wang GZ, Li M, Zhang CH, Cheng HJ, Gao Y, Deng WQ, Li TH. Transcriptome and proteome analyses reveal the regulatory networks and metabolite biosynthesis pathways during the development of *Tolypocladium guangdongense*[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 2081-2094
- [10] Wright M. The polarity of movement of endogenously produced IAA in relation to a gravity perception mechanism[J]. Journal of Experimental Botany, 1982, 33(5): 929-934
- [11] Ishimoto M, Rahman SM, Hanafy MS, Khalafalla MM, El-Shemy HA, Nakamoto Y, Kita Y, Takanashi K, Matsuda F, Murano Y, et al. Evaluation of amino acid content and nutritional quality of transgenic soybean seeds with high-level tryptophan accumulation[J]. Molecular Breeding, 2010, 25(2): 313-326
- [12] Maeda H, Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54: 43-71

林群英, 李泰辉, 宋斌, 黄浩. 广东虫草与冬虫夏草及蛹虫草的成分比较[J]. 食用菌学报, 2009, 16(4): 54-57

[3] Lin QY, Li T, Song B, Li TH. Studies on submerged culture and chemical components of *Cordyceps guangdongensis* mycelial[J]. Food Research and Development, 2014, 35(3): 85-87 (in Chinese)

林群英, 李挺, 宋斌, 李泰辉. 广东虫草深层发酵及菌丝体成分分析[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3): 85-87

[4] Yan WJ, Li TH, Jiang ZD. Antiviral activity of *Cordyceps guangdongensis* against influenza virus infections in mice[J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(3): 64-66 (in Chinese)

闫文娟, 李泰辉, 姜子德. 广东虫草抗禽流感病毒的初步研究[J]. 食用菌学报, 2010, 17(3): 64-66

[5] Yan WJ, Jiang ZD, Li TH. Therapeutic effects of *Cordyceps guangdongensis* on chronic renal failure rats induced by adenine[J]. Mycosystema, 2012, 31(3): 432-442

闫文娟, 李泰辉, 姜子德. 广东虫草对腺嘌呤诱导的慢性肾衰竭大鼠的治疗作用[J]. 菌物学报, 2012, 31(3): 432-442

[6] Yan WJ, Li TH, Lao JH, Song B, Shen YH. Anti-fatigue property of *Cordyceps guangdongensis* and the underlying mechanisms[J]. Pharmaceutical Biology, 2013, 51(5): 614-620

[7] Lin QY, Li TH, Huang H, Song B. Studies on light and temperature conditions for cultivation of *Cordyceps guangdongensis*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2009, 30(1): 42-45 (in Chinese)

林群英, 李泰辉, 黄浩, 宋斌. 广东虫草人工栽培的光温条件研究[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(1): 42-45

[8] Lin QY, Song B, Huang H, Li TH. Optimization of selected cultivation parameters for *Cordyceps guangdongensis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(2): 219-225

[9] Wang GZ, Li M, Zhang CH, Cheng HJ, Gao Y, Deng WQ, Li TH. Transcriptome and proteome analyses reveal the regulatory networks and metabolite biosynthesis pathways during the development of *Tolypocladium guangdongense*[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 2081-2094

[10] Wright M. The polarity of movement of endogenously produced IAA in relation to a gravity perception mechanism[J]. Journal of Experimental Botany, 1982, 33(5): 929-934

[11] Ishimoto M, Rahman SM, Hanafy MS, Khalafalla MM, El-Shemy HA, Nakamoto Y, Kita Y, Takanashi K, Matsuda F, Murano Y, et al. Evaluation of amino acid content and nutritional quality of transgenic soybean seeds with high-level tryptophan accumulation[J]. Molecular Breeding, 2010, 25(2): 313-326

[12] Maeda H, Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54: 43-71

- Plant Biology, 2012, 63(1): 73-105
- [13] Qian X, Yu KJ, Yuan GS, Yang HY, Pan QH, Zhu BQ. Research progress in plant anthranilate synthase[J]. Journal of Tropical Biology, 2015, 6(4): 504-511 (in Chinese)
钱旭, 于可济, 袁冠绅, 杨航宇, 潘秋红, 朱保庆. 植物中邻氨基苯甲酸合成酶的研究进展[J]. 热带生物学报, 2015, 6(4): 504-511
- [14] Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(1): 13-24
- [15] Ma CJ, Wang GZ, Zhou SS, Luo Y, Gong YH, Bian YB. Functional analyses of anthranilate synthase gene *LetrpE* in *Lentinula edodes* by RNAi mediated gene knockdown[J]. Mycosystema, 2018, 37(5): 576-583 (in Chinese)
马超君, 王刚正, 周莎莎, 罗义, 龚钰华, 边银丙. RNAi 法分析香菇邻氨基苯甲酸合酶基因功能[J]. 菌物学报, 2018, 37(5): 576-583
- [16] Wang GZ, Luo Y, Wang C, Zhou Y, Mou CY, Kang H, Xiao Y, Bian YB, Gong YH. Hsp40 protein LeDnaJ07 enhances the thermotolerance of *Lentinula edodes* and regulates IAA biosynthesis by interacting LetrpE[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 707
- [17] Zhang CH, Deng WQ, Yan WJ, Li TH. Whole genome sequence of an edible and potential medicinal fungus, *Cordyceps guangdongensis*[J]. G3-Genes Genomes Genetics, 2018, 8(6): 1863-1870
- [18] Wen Q, Zou M, Jin G, Guo DD, Wei ZF, Shen JW. Cloning and prokaryotic expression analysis of urease gene *Pourease* from *Pleurotus ostreatus*[J]. Mycosystema, 2018, 37(11): 1498-1506 (in Chinese)
文晴, 邹明, 靳橄, 郭丹丹, 魏忠方, 申进文. 糙皮侧耳脲酶基因的克隆和原核表达分析[J]. 菌物学报, 2018, 37(11): 1498-1506
- [19] Zhang Y, Huang TH, Zhang XL, Liu TK, Hou XL, Li Y. Cloning and expression analysis of *BcSERK1* from non-heading Chinese cabbage[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2019, 42(6): 1014-1021 (in Chinese)
张娅, 黄天虹, 张西林, 刘同坤, 侯喜林, 李英. 不结球白菜 *BcSERK1* 基因的克隆及表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(6): 1014-1021
- [20] Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van De Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327
- [21] Wang GZ, Cheng HJ, Li M, Zhang CH, Deng WQ, Li TH. Selection and validation of reliable reference genes for *Tohyopocladium guangdongense* gene expression analysis under differentially developmental stages and temperature stresses[J]. Gene, 2020, 734: 144380
- [22] Bian YB. Edible Mushroom Cultivation[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2017: 1-338 (in Chinese)
边银丙. 食用菌栽培学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2017: 1-338
- [23] Dubouzet JG, Ishihara A, Matsuda F, Miyagawa H, Iwata H, Wakasa K. Integrated metabolomic and transcriptomic analyses of high-tryptophan rice expressing a mutant anthranilate synthase alpha subunit[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(12): 3309-3321
- [24] Sun JY, Manmathan H, Sun C, Peebles CAM. Examining the transcriptional response of overexpressing anthranilate synthase in the hairy roots of an important medicinal plant *Catharanthus roseus* by RNA-seq[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16: 108
- [25] Wang GZ, Ma CJ, Luo Y, Zhou SS, Zhou Y, Ma XL, Cai YL, Yu JJ, Bian YB, Gong YH. Proteome and transcriptome reveal involvement of heat shock proteins and indoleacetic acid metabolism process in *Lentinula edodes* thermotolerance[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 50(5): 1617-1637