环境昆虫学报 2025，47（5）：1548-1569
Journal of Environmental Entomology
http://hjkcxb.alljournals.net
doi:10.3969/j.issn.1674-0858.2025.05.20

王莉娇，饶中臣，廖慧琳，韩日畴，金永玲，曹莉. 硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬促进冬虫夏草菌二型态转化的相关基因和通路分析[J]. 环境昆虫学报，2025，47（5）：1548-1569. WANG Li-Jiao, RAO Zhong-Chen, LIAO Hui-Lin, HAN Ri-Chou, JIN Yong-Ling, CAO Li. Analysis of the related genes and pathways related to dimorphic transition of *Ophiocordyceps sinensis* promoted by kanamycin sulfate and naftifine hydrochloride [J]. *Journal of Environmental Entomology*，2025，47（5）：1548-1569.

硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬促进冬虫夏草菌二型态转化的相关基因和通路分析

王莉娇[1,2*]，饶中臣[2*]，廖慧琳[1,2]，韩日畴[2]，金永玲[1**]，曹 莉[2**]
（1. 黑龙江八一农垦大学农学院，黑龙江大庆 163319；2. 广东省科学院动物研究所，广东省动物保护与资源利用重点实验室，广东省野生动物保护与利用公共实验室，广州 510260）

摘要：冬虫夏草（Chinese cordyceps）是冬虫夏草菌*Ophiocordyceps sinensis*寄生于鳞翅目蝙蝠蛾科Hepialidae昆虫幼虫上形成的虫菌复合体，具有抗疲劳、抗衰老、治疗肺肾疾病等多种功效。虽然冬虫夏草人工培育技术业已建立，但冬虫夏草菌进入寄主后从芽生孢子转化为菌丝（即二型态转化）再形成僵虫的效率直接影响人工培育的成本。为促进冬虫夏草菌二型态转化，本研究分析了冬虫夏草菌响应外源化合物硫酸卡那霉素（Kanamycin sulfate）或盐酸萘替芬（Naftifine hydrochloride）的转录组，共获得2 801个差异表达基因。富集分析结果显示，硫酸卡那霉素处理芽生孢子3 d的上下调的基因主要富集于碳水化合物代谢途径，而盐酸萘替芬处理芽生孢子3 d的上调基因主要富集于谷胱甘肽代谢、脂肪酸分解和过氧化物酶体等通路；下调基因均显著富集于糖酵解、TCA循环、脂肪酸合成、核糖体和转录翻译等相关通路。研究结果为阐明冬虫夏草菌二型态转化的分子机制及提升冬虫夏草人工培育效率提供新思路。

关键词：冬虫夏草菌；二型态；硫酸卡那霉素；盐酸萘替芬；转录组
中图分类号：Q963；Q969.97 **文献标识码：**A **文章编号：**1674-0858（2025）05-1548-22

Analysis of the related genes and pathways related to dimorphic transition of *Ophiocordyceps sinensis* promoted by kanamycin sulfate and naftifine hydrochloride

WANG Li-Jiao[1,2*], RAO Zhong-Chen[2*], LIAO Hui-Lin[1,2], HAN Ri-Chou[2], JIN Yong-Ling[1**], CAO Li[2**]
(1. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang Province, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangdong Public Laboratory for Wildlife Protection and Utilization, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Chinese cordyceps, a parasitic complex formed by the larvae of Hepialidae (Lepidoptera) and the fungus *Ophiocordyceps sinensis*, exhibits various therapeutic properties, such as anti-fatigue, anti-aging effects, and the treatment of pulmonary and renal diseases. Although artificial cultivation techniques for Chinese cordyceps have been established, the dimorphic transition of *O. sinensis*, from blastospores to

基金项目：广东省科学院发展专项资金项目（2024GDASZH-2024010101）；广东省重点领域研发计划项目（2020B1111580001）
*共同第一作者：王莉娇，硕士，研究方向为植物保护，E-mail：1824801319@qq.com；饶中臣，博士，助理研究员，研究方向为生物化学与分子生物学，E-mail：xipredus@163.com
**共同通讯作者 Author for correspondence：金永玲，博士，教授，研究方向为植物保护，E-mail：gygjyl08@163.com；曹莉，硕士，研究员，研究方向为生物农药产业化和冬虫夏草研发，E-mail：caol@giz.gd.cn
收稿日期Received：2025-03-21；修回日期Revision received：2025-05-14；接受日期Accepted：2025-05-15

hyphae after infecting the host, and ultimately forming mummified insect, remains a major bottleneck that directly affects the cultivation efficiency and cost. To promote this dimorphic transition, transcriptome analysis was performed on blastospores treated with exogenous compounds—kanamycin sulfate and naftifine hydrochloride, resulting in the identification of 2 801 differentially expressed genes (DEGs). Enrichment analysis revealed that, after three days of kanamycin sulfate treatment, both up- and down-regulated genes were predominantly associated with carbohydrate metabolism. In contrast, in naftifine hydrochloride-treated spores over three days, up-regulated genes were mainly enriched in glutathione metabolism, fatty acid degradation, and peroxisome pathways, while down-regulated genes were significantly enriched in glycolysis, the tricarboxylic acid (TCA) cycle, fatty acid biosynthesis, ribosome, and transcription/translation processes. These findings provide novel insights into the molecular mechanisms of the dimorphic transition in *O. sinensis* and suggest potential strategies for improving the efficiency of its artificial cultivation.

Key words: *Ophiocordyceps sinensis*; dichotypy; kanamycin sulfate; naftifine hydrochloride; transcriptome

冬虫夏草是传统的医药和滋补珍品，由冬虫夏草菌*Ophiocordyceps sinensis*特异性地侵染鳞翅目蝙蝠蛾科昆虫幼虫形成的独特菌虫复合体（Sung *et al.*，2007；Lo *et al.*，2013；Tong *et al.*，2023），主要分布在青藏高原海拔3 000~5 000 m之间区域（Li *et al.*，2023）。冬虫夏草具备抗疲劳、抗衰老、治疗肺肾疾病以及免疫调节等多重功效（Wong *et al.*，2007；Zhou *et al.*，2014；Liu *et al.*，2015；Liu *et al.*，2021），不仅在我国中医药体系里占据关键地位，而且也被东南亚视为药物和保健食品领域的宝贵生物资源（Yue *et al.*，2013a；Li *et al.*，2016；Baral，2017；Qin *et al.*，2018；Pouliot *et al.*，2018）。

目前，冬虫夏草的自然存续正面临严峻挑战。一方面，全球气候变暖和过度采挖严重限制其天然产量；另一方面，随着当代科学探索不断深入挖掘冬虫夏草的药用价值，引起市场需求量急剧攀升（Paterson，2008；Shrestha *et al.*，2014）。冬虫夏草市场价格高昂，野生冬虫夏草售价高达60 000~75 000美元/Kg（Holliday *et al.*，2008；Yue *et al.*，2013b；韩日畴等，2019）。为了保护青藏高原的生态环境和珍稀生物资源，满足市场对冬虫夏草的刚性需求，冬虫夏草的人工培育成为当代热点赛道。

冬虫夏草人工培育过程主要包括五个关键阶段：首先是冬虫夏草菌的孢子（子囊、芽生、分生）对蝠蛾属幼虫的感染（Liu *et al.*，2019；Liu *et al.*，2020a）；随后，芽生孢子开始在被感染幼虫的血淋巴中增殖；在血淋巴中未知信号的诱导下，芽生孢子转变为菌丝，幼虫虫体被菌丝逐渐“木乃伊化”成为僵虫；最终从僵虫头部长出子座（Meng *et al.*，2015；Rao *et al.*，2019；Wu *et al.*，2020）。

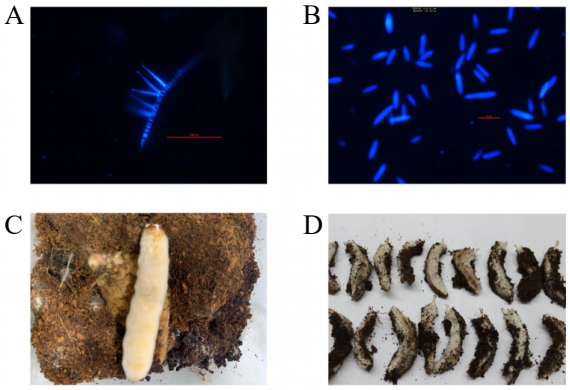

图1 冬虫夏草人工培育过程中的关键阶段

Fig. 1 Key stages in the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis*

注：A，冬虫夏草菌的子囊孢子；B，冬虫夏草菌的芽生孢子；C，僵虫形态；D，僵虫头部生长出的子座。Note: A, Ascospores of *O. sinensis*; B, Blastospores of *O. sinensis*; C, Morphology of the mummified insect; D, Stromata growing from the head of the mummified insect.

真菌菌体形态在酵母型或纺锤型与菌丝型之间发生转化的二型态现象是真菌快速适应外界环境及宿主多变微环境的生存机制。典型二型态真菌：玉米黑粉菌*Ustilago maydis*、白色念珠菌*Candida albicans*、酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*等。触发二型态真菌形态转化的环境因子主要有：营养缺乏（Naseem *et al.*，2011）、中性pH

(Jürgensen *et al.*, 2001)、温度改变(Bastidas *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2022)、血清以及群体感应相关分子调控等(Albuquerque *et al.*, 2012; Berrocal *et al.*, 2012; 王天旭等, 2020)。二型态真菌的信号转导途径主要包括MAPK途径(Mitogen-activated protein kinase pathway)、cAMP-PKA途径(cAMP-protein kinase A pathway)、TOR途径(Target of rapamycin)、Rim101途径、Ca^{2+}/Calcineurin途径以及Tup1介导的负调控通路等(Chaves *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2018; Gómez-Gil *et al.*, 2019; 王天旭等, 2020)。

现已证明,冬虫夏草菌也存在二型态现象(纺锤型芽生孢子与菌丝型)(Li *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020a; Wu *et al.*, 2022),该形态转换受三类关键诱导因子协同调控:法尼醇、乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine)和昆虫蜕皮激素(20-hydroxyecdysone)(Liu *et al.*, 2020b);另有研究表明,冬虫夏草菌寄主蝙蝠蛾幼虫血淋巴中的其它微生物可能在其二型态转化过程中发挥重要作用(Wu *et al.*, 2021)。此外,代谢组学分析结果表明,碳源代谢和一些氨基酸合成通路在冬虫夏草菌菌丝发育中发挥作用(Li *et al.*, 2020)。值得注意的是,神经递质乙酰胆碱和甘露醇可能介导被冬虫夏草菌感染小金蝠蛾幼虫的僵化(Chai *et al.*, 2024a, 2024b)。基于此,Sun等(2024)利用siRNA敲低小金蝠蛾的多个表皮蛋白基因,成功诱导芽生孢子向预菌丝转化,但该过程的分子机制仍存在关键知识缺口。

探索外源化合物对冬虫夏草菌从芽生孢子向菌丝转化的诱导作用,一直是重要的研究方向。硫酸卡那霉素是一种氨基糖苷类抗生素,通过选择性结合细菌核糖体30s亚基的16s rRNA的A位点来发挥抗菌活性,从而干扰蛋白质合成,最终导致细菌死亡(Subedi *et al.*, 2018; Poudyal *et al.*, 2024)。部分经过修饰的硫酸卡那霉素呈现出广谱抗真菌性,影响真菌细胞壁或膜通透性(Subedi *et al.*, 2018),进而干扰真菌形态发育过程。而盐酸萘替芬是一种临床常用的烯丙胺类抗真菌药,可有效抑制真菌麦角甾醇生物合成并导致真菌体内鲨烯的积聚,从而破坏细胞膜结构及功能(Gupta *et al.*, 2008)。

基于前期试验结果中显示,证实了硫酸卡那霉素与盐酸萘替芬均能显著提高冬虫夏草菌芽生孢子向菌丝转化的效率。分别将这两种化合物和冬虫夏草菌芽生孢子共同加入液体培养基,培养3 d取样,利用高通量测序平台进行转录组测序,筛选冬虫夏草菌在两种化合物作用下的差异表达基因,进行GO分析(Gene ontology)、KEGG分析(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)和GSEA分析(Gene set enrichment analysis),挖掘可促进冬虫夏草菌二型态转化的相关关键基因与分子通路,为阐明外源物质调控冬虫夏草二型态转化机制及提升冬虫夏草人工培育效率提供新思路。

1 材料与方法

1.1 冬虫夏草菌培养

冬虫夏草菌KD1223菌株,分离自四川省康定市采集的野生冬虫夏草,使用PMG液体培养基(去皮土豆200 g、麦芽糖20 g、蛋白胨10 g、磷酸二氢钾3 g、硫酸镁1.5 g、维生素B_1 20 mg、大蜡螟5 g、水1 L)(Liu *et al.*, 2018)于9~13℃ 120 rpm摇床上培养45 d。待培养液中芽生孢子浓度达到10^6个/mL时,收集芽生孢子,并用磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH6.2)重悬至浓度为10^8个/mL悬浮液备用。于96孔细胞培养板每孔分别加入80 μL PM液体培养基(去皮土豆200 g、麦芽糖20 g、蛋白胨10 g、磷酸二氢钾3 g、硫酸镁1.5 g、维生素B_1 20 mg、水1 L),10 μL芽生孢子(10^8个/mL),以及10 μL硫酸卡那霉素或盐酸萘替芬。每孔共加入溶液为100 μL,芽生孢子浓度为10^7个/mL。硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬的浓度分别为20 mM和0.2 mM。以无菌超纯水及0.1%二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)作为对照,96孔细胞培养板置于9~13℃培养3 d。

1.2 取样镜检

在用硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬处理芽生孢子3 d后,分别从各处理组和对照组中取样10 μL,并加入等量的Calcofluor White Stain染色液充分混匀。之后,吸取10 μL染色悬液置于血球计数板上进行镜检,精确计数芽生孢子和预菌丝的数量。每个处理设置3个重复。

1.3 RNA的制备,文库构建和测序

将收集的菌体,使用液氮速冻后储存在-80℃冰箱。利用*TransZol* Up(全式金,北京中国)提取总RNA,以Nanodrop ND-2000分光光度计

（Thermo Scientific，Massachusetts，MA，USA）、琼脂糖凝胶电泳、Qubit 2.0和Agilent 2100生物分析仪（Agilent，Santa Clara，CA，USA）分别测定样品中RNA的浓度、纯度和质量。RIN值大于7的样本用于后续文库构建。本试验共构建12个cDNA文库，即对照无菌超纯水处理3 d（W3）、硫酸卡那霉素处理3 d（K3）以及盐酸萘替芬处理3 d（N3）及其对照0.1% DMSO处理3 d（D3）的冬虫夏草菌cDNA文库。每个处理设置3个生物重复，每个生物重复包含14个单独培养的冬虫夏草菌独立样本（96孔板种每孔为一个样本）。文库的定量和质量通过Qubit 2.0、Agilent 2100生物分析仪（Agilent，Santa Clara，CA，USA）和ABI StepOnePlus Real-Time PCR系统（ABI，Waltham，MA，USA）上进行分析。利用Illumina NovaSeq 6000平台（Illumina，San Diego，CA，USA）进行文库测序。

1.4 转录组质控及新转录本预测

使用fastp对下机后的raw read进行质控，过滤低质量数据（Chen，2023）。随后，利用Hisat2（v.2.0.6）（Kim *et al.*，2015）将过滤后的clean read比对到冬虫夏草菌基因组（待发表数据）。接着，使用StringTie（v.1.0.4）重建转录本（Pertea *et al.*，2015），并通过Cufflinks（v.2.2.1）预测潜在的新转录本（Trapnell *et al.*，2012）。最后，所有新的转录本都使用BlastX（E-value < 1×10^{-5}），针对NCBI非冗余蛋白质数据库（Non-redundant proteins，NR）和蛋白质序列数据库（Swiss-prot）进行注释。

1.5 基因差异表达分析

使用RSEM（RNA-seq by expectation-maximization）计算每个样本中所有基因的表达量（Li *et al.*，2011），得到read count，同时使用FPKM（Fragments per kilobase per million base）方法校正各个样本测序深度与基因或转录本序列长度的偏差。以read counts作为输入，用edgeR（Robinson *et al.*，2010）进行基因差异表达分析基因。利用Benjamini等（1995）的方法矫正*P*值，以检验结果中假阳性的概率（False discovery rate，FDR），显著差异表达基因的筛选阈值为$|\mathrm{Log_2}(\text{Fold change})| \geqslant 1$和FDR ⩽ 0.05。

1.6 差异基因富集分析

本研究采用GOatools（https://github.com/tanghaibao/GOatools）对差异表达基因（DEGs）进行基因本体（GO）功能富集分析，并使用KOBAS（http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do）对差异基因进行KEGG通路富集分析。上述两种富集分析的显著性阈值均设定为$P \leqslant 0.05$。此外，还利用GSEA对所有基因进行功能富集分析。GSEA使用的基因集来自冬虫夏草菌所有基因的KEGG和GO注释基因集，阈值设定为FDR ⩽ 0.05。

1.7 qRT-PCR验证

使用qRT-PCR方法来验证RNA-seq数据的可靠性。引物设计基于NCBI数据库中的Premier-Blast（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/）（表1），并由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，试剂盒使用*TransScript*® Uni All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR（One-Step gDNA Removal）（全式金，中国北京）。对转录组返样的1 μg RNA用于反转录合成cDNA。qRT-PCR试验20 μL反应体系由2 μL cDNA（稀释倍数1：5）、10 μL 2 × *PerfectStart*® Green qPCR SuperMix（全式金，中国北京）、各0.4 μL（0.2 mM）上下游引物和7.2 μL无菌水组成，用于qPCR反应。本试验以*Actin*基因作为内参，在StrataGene Mx3000P qPCR系统（Agilent，Santa Clara，CA，USA）上进行所有反应。将热循环条件设定为94℃持续30 s的初始变性；随后是40个循环的94℃持续5 s、60℃持续15 s和72℃持续10 s的扩增。然后，将55℃~95℃的熔解曲线分析应用于所有反应，以确保扩增产物的一致性和特异性。每组样品设置3个生物学重复，每个生物学重复包括3次技术重复，并使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对表达水平。在回归分析中，RNA-seq的倍数变化是$\mathrm{Log_2}$（Fold change），qRT-PCR的倍数变化是-ΔΔCt（Livak *et al.*，2001）。

1.8 数据分析

数据分析利用IBM SPSS Statistics（v.27.0），参数统计分析采用单因素方差分析（ANOVA），并结合Tukey's多重比较方法进行组间差异分析；绘图采用GraphPad Prism（v.10.4）软件、Adobe Illustrator（v.2024）以及生物医学通用绘图平台GDP：https://biogdp.com；微生信云平台：:http://www.bioinformatics.com.cn/；ChiPlot网站：https://www.chiplot.online/。

表1 qRT-PCR引物

Table 1 qRT-PCR primer

基因 Gene	上游引物序列 Sequence of sense primer (5′→3′)	下游引物序列 Sequence of anti-sense primer (5′→3′)
Actin	ACGATTGGCAACGAGCGGTTC	TCATGGACGAAGGAGCGAGACC
NOG1	CTCGAAAACCCCGAGTGGAA	TTCACTGCTTTGCGGGGTAT
tif211	GCCGAAAAGACACAAACCCC	AGTGAGGCGCTTGCTTATGT
mnh1	TTTGACTTCAGGGTCGTGGG	AGAGACCCTATCTTGGCCGT
aac	TCGTCGATGTCTACCGCAAG	ACCAACCGAGAGCGAATGAG
rpl8	AGTACGGCCTCAATCACGTC	CGACAGCTCGTTCTTGTCCT
rps602	AGGATGACGATGTCCGCAAG	GATCTGGGCGTACTCGTTGG
gedE	TCAACAGATATGCGCCGGAA	CCACTTTTGGACGTGAGGGA
dtxS4	CCGCTTTGGCTTTGAAGGTC	GCTTGTCGGGCCTCATTTTG
cpaH	ACATCCCGGAAAGATGGCTG	GGCCAACTCGAAATCGAAGC
HGT1	CGAGCTGTACCCCTTACGTC	TCCGTCTCCTCGAGTGTCTT
PMP47B	AACTCTTCGCAACCTCGGTC	GCAGTCAGGACGCTTTGAGT
MDR5	CGGGGCTTTGGGAAAATTGG	TCCACCGTCTGAAAGGCTTC
GPI16	GCCAAAGAGACGGCAACATC	GCGGTCGTAGAGGTTGTGAA
PXA1	TCTTTACCACGAGCCGCAAT	ATCCGCTCGAATTCCCATCC
TUB1	CGACCTCACCTTTCAGTGCT	GCCACGGGCTTCTGATAGTT
ISU1	GCACCATTACCGACGCAAAG	CGTCTTCGGCGAGCATAGAG
BEA3	TACATATCCCACTCGCACGC	GAAAGGTGGCTCCGGTACTC
MAL11	GCTTGTCAGTGAGCTGTCCT	CGTCTGTCGTGGCAAACTTC
mfs1	GCGTCTTCCTCTACTGCTCC	GTGCCGTTGTTTGGAGGTTC
SPBC3B8.04c	AGTTCCATACTCCGCTTGGC	ACAAGAAGGGGATGAGCAGC
spn4	GAAGTTGCGGTCCATCCTCA	CTCGATCTTGACCTGCTCGG
SU2	GCTGGACCCTAAAGGACACC	ACCAAAGCCCTTGACGAACT
ntf2	TCGGAGTCTCAAGCATCGTG	CGAGTTGAAAGGCTTGCGTG
prt-1	GTCTCCTTTTTCTGCCCGGA	TCTCAGCCTCCAGCTTTTCG
TUB1	CTTCCCCCTGGTTGCCTATG	GTAGCAGATGCCGAGCTTGA

2 结果与分析

2.1 化合物对冬虫夏草菌芽生孢子二型性转化的影响

Calcofluor White Stain染色液能够与冬虫夏草菌细胞壁中的几丁质发生特异性结合（Marines *et al.*，1987；Liu *et al.*，2019），并在荧光显微镜下呈现亮蓝色荧光。外源添加硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬处理3 d后，可显著促进冬虫夏草菌KD1223芽生孢子的预菌丝转化率（图2）。无菌超纯水与0.1% DMSO对照组之间未观察到显著性差异。然而，在分别加入硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬处理3 d后，与对照组（无菌超纯水和0.1% DMSO）相比，冬虫夏草菌KD1223芽生孢子的预菌丝转化率分别提高了5.82%和22.42%。

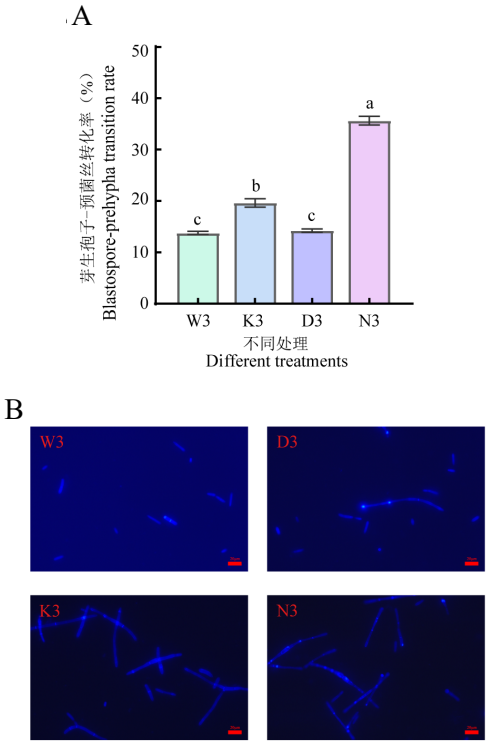

图2 外源添加硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬对冬虫夏草菌芽生孢子二型性转化的影响

Fig. 2 Effect of exogenous addition of kanamycin sulfate and naftifine hydrochloride on the dimorphic transition of blastospores in *Ophiocordyceps sinensis*

注：图中数据为平均值±标准误，小写字母表示各处理间在0.05水平上差异显著。A，硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬及其对照体外培养冬虫夏草菌芽生孢子3 d（F = 260.746，P < 0.001，Tukey′s多重比较）；B，体外培养3 d冬虫夏草菌芽生孢子在400×放大的微观图像；W，无菌超纯水；K，硫酸卡那霉素；D，0.1% DMSO；N，盐酸萘替芬。Note: The data were presented as the mean ± standard error. Lowercase letters indicated significant differences among treatments at 0.05 level. A, In vitro cultivation of *O. sinensis* blastospores for 3 days with exogenous addition of kanamycin sulfate and naftifine hydrochloride and their controls (F = 260.746, P < 0.001, Tukey′s multiple comparisons); B, The microscopic images of *O. sinensis* blastospores cultured in vitro for 3 days at 400× magnification; W, sterile ultrapure water; K, kanamycin sulfate; D, 0.1% DMSO; N, naftifine hydrochloride.

2.2 测序质控结果

为了揭示W3、K3、D3和N3四个处理组之间的分子调控网络特征，采用高通量测序技术对各样本的转录本进行了深度测序。各样本共获得约77.89 Gb的原始数据（raw data），平均每个样本产生约6.49 Gb的reads。通过对原始数据的质量控制和数据过滤，去除接头序列和poly-N序列（N占比超过整个read的50%），全是A碱基的序列和低质量序列（Q < 20），12个样本的clean data保留率均超过95.67%。具体数据质控情况汇总，各样本Q20比例大于96.77%，Q30比例大于90.82%，说明了转录组质量可靠，完全满足后续分析要求。将clean data比对到冬虫夏草菌参考基因组后，各样本的比对率（mapping rate）均达到95.65%以上，表明大部分read均能比对到参考基因组，适配性良好（表2）。

2.3 样本聚类和主成分分析

为了评估样本间的整体表达模式，本研究绘制了基于表达量的样本热图（图3-A）和主成分分析（Principal component analysis，PCA）图（图3-B）。结果显示，组内样本相关性均较高，组间差异大部分高于组内差异，说明组内样本重复性良好。W3组与D3组之间的相关性较高，这可能是由于两者均为空白对照所致（W3为无菌超纯水对照，D3为0.1% DMSO对照）。此外，W3组与K3组在表达特征上表现出相似性，而N3组则在全局表达模式上显著分离，与其他处理组存在明确差异，这些结果为后续的差异基因筛选提供了重要的数据支持。

2.4 差异表达基因的筛选

采用DESeq2方法对D3 vs. N3和W3 vs. K3两个组间比较进行了差异基因筛选，筛选标准为$|\mathrm{Log_2(Fold\ change)}| \geqslant 1$且FDR ⩽ 0.05。在W3 vs. K3比较组中，共筛选到差异表达基因281个，其中上调基因141个，下调基因140个；在D3 vs. N3比较组中共发现差异表达基因1 658个，其中上调基因1 211个，下调基因447个（图3-C）。

通过Venn分析比较两组差异基因的重叠性（图3-D）。结果显示，在W3 vs. K3和D3 vs. N3中同时上调的基因共有52个，同时下调的基因共有29个。此外，在这两个比较组合中存在趋势相反的基因共60个，其中在W3 vs. K3中下调但在D3 vs. N3中上调的基因有43个；而在W3 vs. K3中上调但在D3 vs. N3中未显著变化或下调的基因有17个。进一步分析表明，W3 vs. K3特有的上调和下调基因分别有72个和68个，而D3 vs. N3特有的上调和下调基因分别有1 116个和401个。

表2 样品测序数据及质量检验

Table 2 Sample sequencing data and quality control

样品 Sample	原始数据（bp） Raw data	清洁数据（bp） Clean data	Q20（%）	Q30（%）	GC（%）	总映射量（%） Total mapped
W3-1	6899411100	6647783806	97.66	93.46	59.42	96.71
W3-2	5448549900	5264242972	97.41	92.64	59.38	96.74
W3-3	5945236500	5753143983	97.65	93.26	59.29	97.37
K3-1	7011258900	6777009031	97.48	92.88	59.37	96.67
K3-2	7252174800	7021591885	97.31	92.36	59.48	96.38
K3-3	6110327100	5964741790	97.28	92.39	59.58	96.32
D3-1	6188709000	5949336292	97.19	92.03	59.60	96.25
D3-2	6935377500	6635222778	96.77	90.82	59.42	96.21
D3-3	6336470700	6104488213	97.36	92.62	59.31	96.52
N3-1	6892437900	6617025845	97.18	92.06	59.80	96.15
N3-2	6247002000	6060124055	97.50	93.02	59.66	96.12
N3-3	6627391200	6346671735	97.39	92.80	59.31	95.65

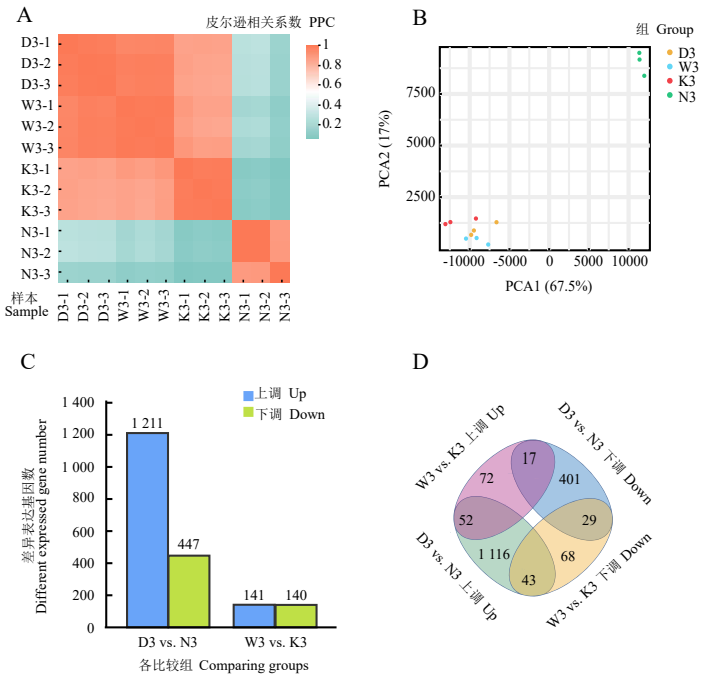

图3 硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬分别处理样本的整体表达模式及差异表达基因

Fig. 3 Overall expression pattern and DEGs in samples treated with kanamycin sulfate or naftifine hydrochloride

注：A，不同化合物处理下冬虫夏草菌的重复样本热图；颜色光谱从青色经过白色到红色，代表皮尔逊相关系数从0.62至1，数值越高则相关性越强；B，不同化合物处理下冬虫夏草菌转录组样本的主成分分析结果；C，不同比较组的差异表达基因数量统计；D，两个比较组上下调基因的Venn图。Note: A, Heat map depicting the Pearson correlation coefficient among replicate samples of *O. sinensis* treated with different compounds. The color spectrum rangeed from cyan through white to red, representing the Pearson correlation coefficient from 0.62 to 1. Higher values indicated stronger correlations; B, Principal component analysis (PCA) of the transcriptome samples from *O. sinensis* s treated with different compounds; C, Quantification of DEGs in two comparison groups; D, Venn diagrams illustrating the overlap of up-regulated and down-regulated genes between two comparison groups.

2.5 差异基因GO功能富集分析

从生物过程、细胞组成、分子功能3个方面来描述差异基因的生物学功能（图4）。在W3 vs. K3比较组中显著富集的生物过程有164个，细胞组成有28个，分子功能有111个（$P < 0.05$）。在生物学过程中，差异基因主要富集在碳水化合物代谢过程（Carbohydrate metabolic process）、单羧酸转运（Monocarboxylic acid transport）、碳水化合物运输（Carbohydrate transport）等；在细胞组成中，差异基因主要富集在质膜的组成部分（Integral component of plasma membrane）、质膜的内在成分（Intrinsic component of plasma membrane）、液泡膜的组成部分（Integral component of vacuolar membrane）等；在分子功能中，则主要富集在单羧酸跨膜转运蛋白活性（Monocarboxylic acid transmembrane transporter activity）、碳水化合物跨膜转运蛋白活性（Carbohydrate transmembrane transporter activity）、跨膜转运蛋白活性（Transmembrane transporter activity）等；在D3 vs. N3比较组中，显著富集的生物过程有725个，细胞组成有132个，分子功能有370个（$P < 0.05$）。在生物学过程中，差异基因主要富集在共翻译蛋白靶向膜（Cotranslational protein targeting to membrane）、SRP依赖性共翻译蛋白靶向膜（SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane）、蛋白质靶向ER（Protein targeting to ER）等；在细胞组成中，差异基因主要富集在胞质核糖体（Cytosolic ribosome）、核糖体（Ribosome）和核糖体亚基（Ribosomal subunit）等；在分子功能中，则主要富集在核糖体的结构成分（Structural constituent of ribosome）、结构分子活性（Structural molecule activity）和RNA结合（RNA binding）等。

2.6 差异表达基因KEGG富集分析

在W3 vs. K3组，上下调基因均涉及糖代谢（图5），上调基因主要富集在8个通路中，包括淀粉和蔗糖代谢（Starch and sucrose metabolism）、糖胺聚糖降解（Glycosaminoglycan degradation）、氨基糖和核苷酸糖代谢（Amino sugar and nucleotide sugar metabolism）等通路；而下调基因则主要富集在半乳糖代谢（Galactose metabolism）、果糖和甘露糖代谢（Fructose and mannose metabolism）、花生四烯酸代谢（Arachidonic acid metabolism）。在D3 vs. N3组中，上调基因主要富集在20个通路中，包括ABC转运蛋白（ABC transporters）、过氧化物酶体（Peroxisome）、脂肪酸降解（Fatty acid degradation）和谷胱甘肽代谢（Glutathione metabolism）等通路中；而下调基因则主要富集在核糖体（Ribosome）、脂肪酸生物合成（Fatty acid biosynthesis）和柠檬酸循环（Citrate cycle）等通路。

2.7 基因集富集分析

通过GSEA分析，评估两个比较组中基因集的富集趋势（图6）。结果显示，在W3 vs. K3比较组中，差异基因仅富集在2个基因集，其中上调基因富集在精氨酸和脯氨酸代谢（Arginine and proline metabolism），下调基因则富集在转录因子TFIIA复合体（Transcription factor TFIIA complex）。在D3 vs. N3比较组中，上调基因显著富集在17个基因集中，主要涉及脂代谢和过氧化物酶体，包括脂质分解代谢（Lipid catabolic process）、脂肪酸降解途径（Fatty acid degradation）、过氧化物酶体（Peroxisome）和脂质氧化（Lipid oxidation）等。其中，过氧化物酶体膜（Peroxisomal membrane）这个基因集上调基因超过80%（tag = 81%），富集信号非常集中（signal = 116%），包括了*PMP47B*、*PEX4*、*PEX7*、*PEX10*、*PEX11*、*PEX13*、*PXMP4*和*PXA1*等基因，说明了盐酸萘替芬对过氧化物酶体膜这个组分影响特别大，这个组分基因的上调具有显著的生物学意义；下调基因则显著富集在664个基因集中，主要涉及转录翻译和糖代谢过程，包括核糖体（Ribosome），翻译起始过程（Translational initiation），TCA循环（TCA cycle）和糖酵解/糖异生过程（Glycolysis / Gluconeogenesis）。特别地，核胞质转运活性（Nucleocytoplasmic carrier activity）的基因集下调基因达到94%（tag = 94%），富集信号非常集中（signal = 136%），包括*KAP95*、*KAP104*、*SAL3*、*MSN5*、*KA*和*MSN5*等基因，说明盐酸萘替芬可能显著抑制冬虫夏草菌孢子的核胞质转运活性，影响细胞核和细胞质之间物质的转运。

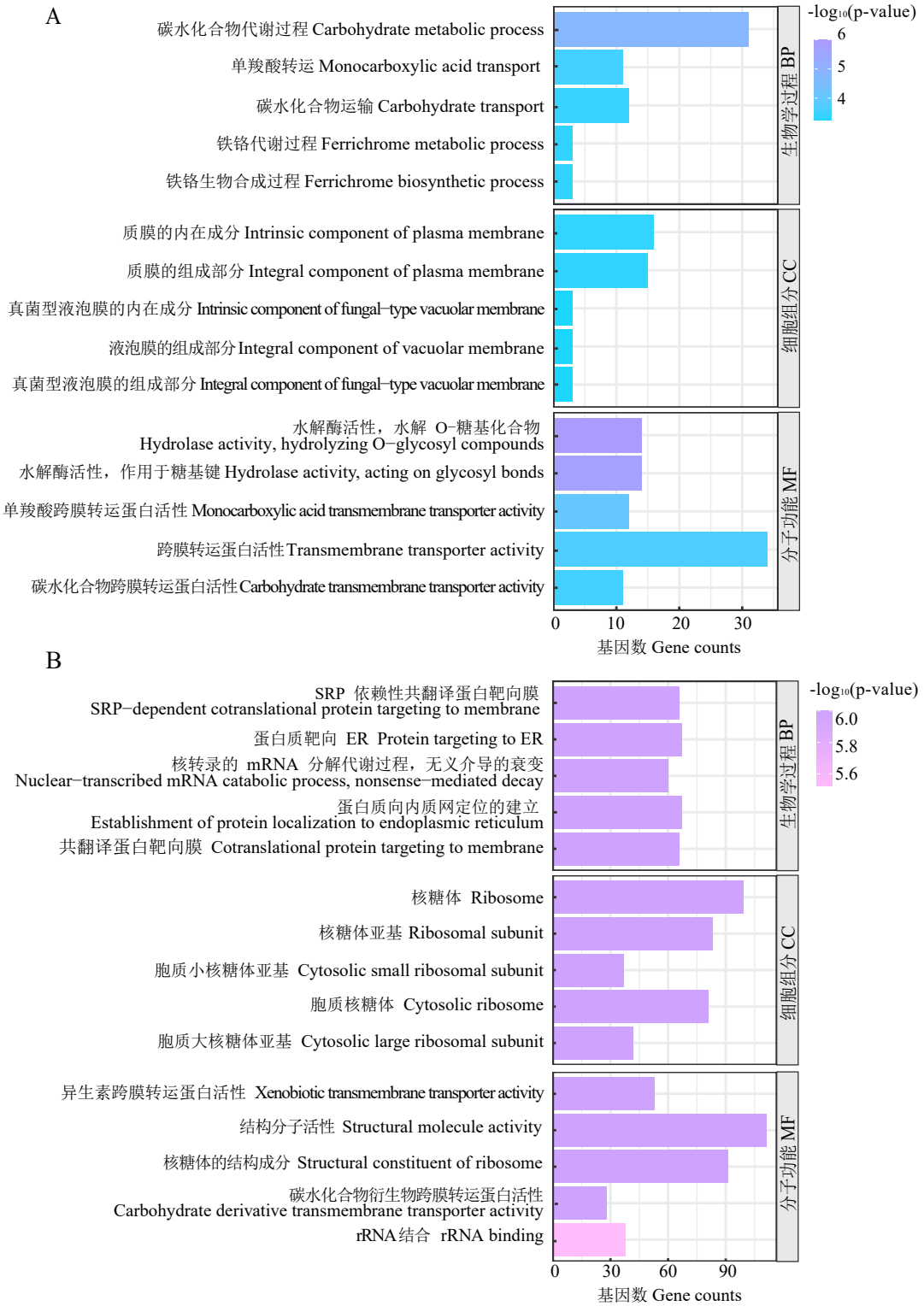

图4 硫酸卡那霉素或盐酸萘替芬体外处理冬虫夏草菌后差异表达基因的GO富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of DEGs in *Ophiocordyceps sinensis* following in vitro treatment with kanamycin sulfate or naftifine hydrochloride

注：A，W3 vs. K3（无菌水与硫酸卡那霉素分别处理冬虫夏草菌3 d）差异基因GO富集分析；B，D3 vs. N3（0.1% DMSO与盐酸萘替芬分别处理冬虫夏草菌3 d）差异基因GO富集分析。Note: A, GO enrichment analysis of DEGs in *O. sinensis* from W3 vs. K3 (day 3 after treatment of blastospores with sterile water and kanamycin sulfate, respectively); B, GO enrichment analysis of DEGs in *O. sinensis* from D3 vs. N3 (day 3 after treatment of blastospores with 0.1% DMSO and naftifine hydrochloride, respectively).

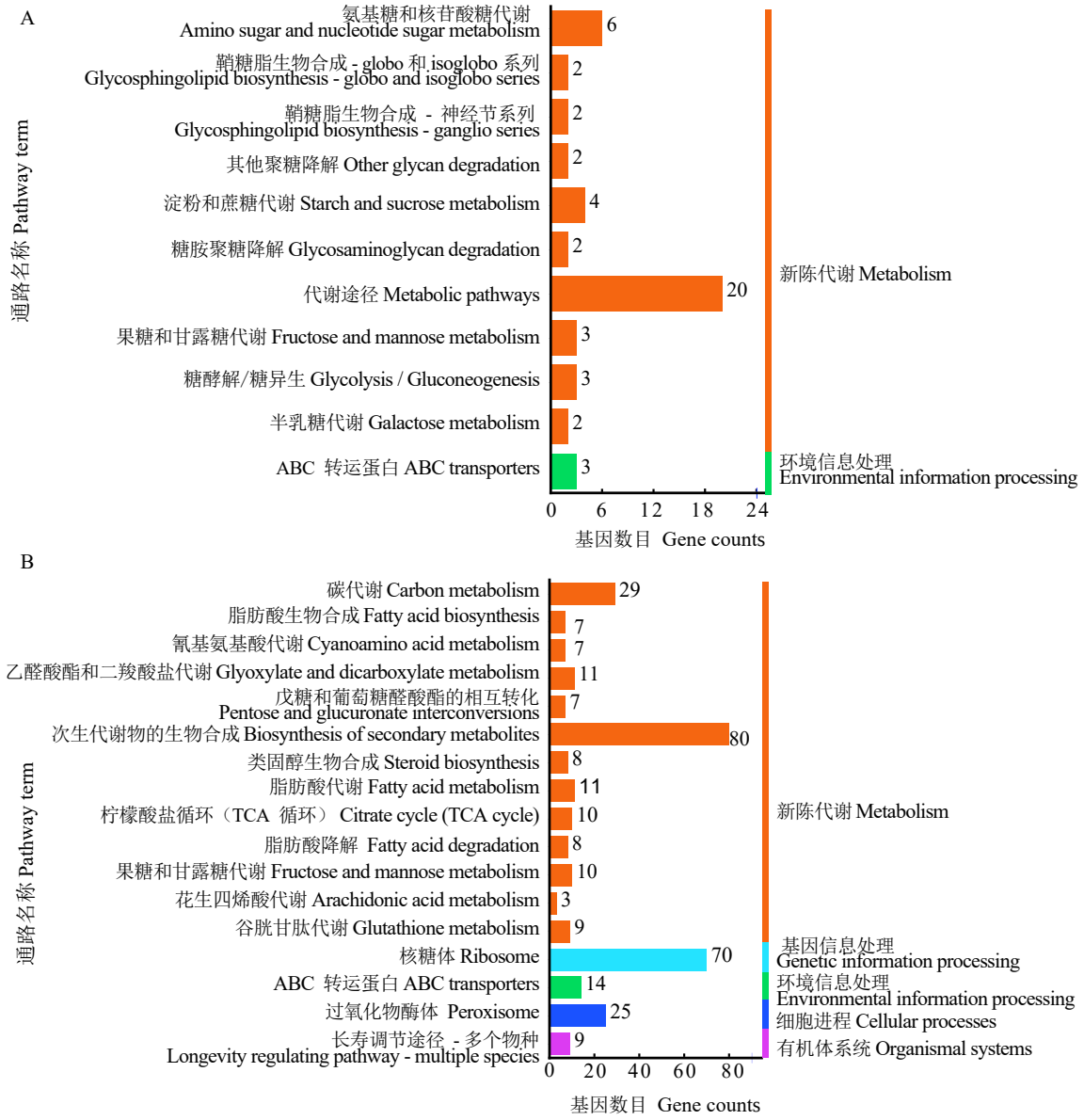

图5 硫酸卡那霉素或盐酸萘替芬体外处理冬虫夏草菌后差异表达基因的KEGG富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of DEGs in *Ophiocordyceps sinensis* in vitro treatment with kanamycin sulfate or naftifine hydrochloride

注：A，是W3 vs. K3组差异表达基因在KEGG通路中的富集分析；B，是D3 vs. N3组差异表达基因在KEGG通路中的富集分析。Note: A, KEGG pathways enrichment analysis of DEGs in the W3 vs. K3 group; B, KEGG pathways enrichment analysis of DEGs in the D3 vs. N3 group.

2.8 盐酸萘替芬诱导谷胱甘肽代谢途径的响应

RNA-seq和qRT-PCR结果表明（图7），在盐酸萘替芬处理后3 d，冬虫夏草菌GSH水解相关途径的关键基因谷胱甘肽转移酶（*GST*，Log_2FC = 1.56）、谷胱甘肽水解酶（*GGT*，Log_2FC = 4.03），金属二肽酶（*DUG1*，Log_2FC = 1.44）、γ-谷氨酰环转移酶（*GGCT*，Log_2FC = 1.41）均为显著上调基因。然而，与GSH的回补相关基因5-氧代脯氨酸酶（*OPLAH*）、谷氨酸-半胱氨酸连接酶（*GCLC*）、谷胱甘肽合成酶（*GSS*）和谷胱甘肽特异性γ-谷氨酰环转移酶（*CHAC*）则轻微上调。此外，催化谷氨酸转化为γ氨基丁酸（GABA）的谷氨酸脱羧酶（*GAD*，Log_2FC = 1.24）基因也显著上调。

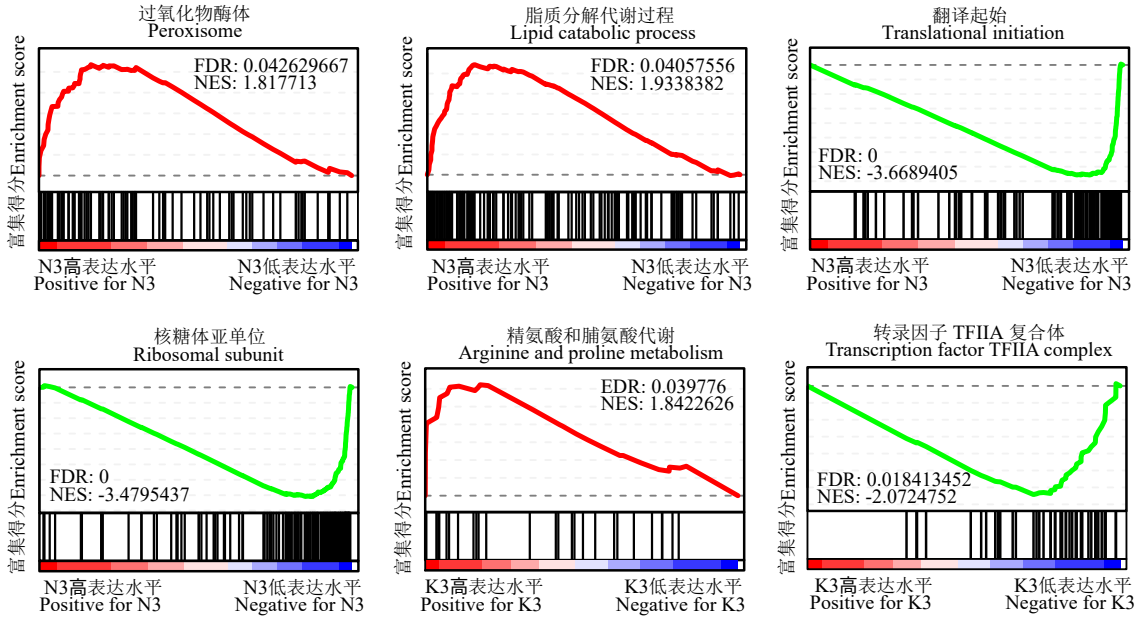

图6 硫酸卡那霉素及盐酸萘替芬体外处理冬虫夏草菌后差异表达基因的GSEA富集分析

Fig. 6 GSEA enrichment analysis of DEGs in *Ophiocordyceps sinensis* following in vitro treatment with kanamycin sulfate and naftifine hydrochloride

注：NES为标准化富集分数，FDR为错误发现率。顶部曲线显示了基因集在排序基因列表中的运行富集分数（ES），中央竖线表示基因在整个基因排序中的分布位置，用于展示基因与表型或分组差异的相关性排序。正（红色）NES和负（蓝色）NES分别表示在K3和N3样本中较高和较低的表达水平。Note: NES refered to the normalized enrichment score, and FDR represented the false discovery rate. The top curve of this figure showed the running enrichment score (ES) of the gene set in the ranked gene list. The central vertical line in this figure indicated the distribution position of the genes in the entire gene ranking, which was used to demonstrate the correlation ranking between the genes and the phenotype or group differences. Positive (red) NES and negative (blue) NES respectively indicated higher and lower expression levels in the K3 and N3 samples.

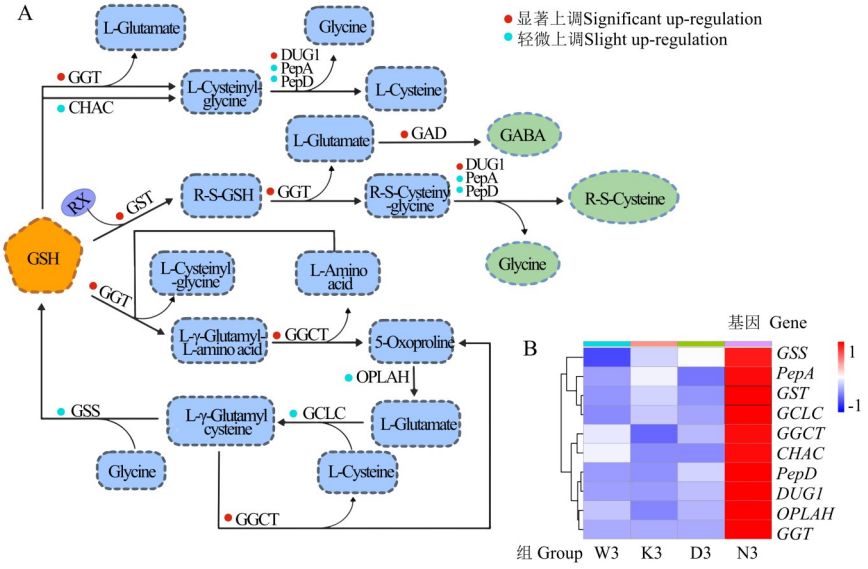

图7 盐酸萘替芬处理下冬虫夏草菌芽生孢子谷胱甘肽代谢途径

Fig. 7 Glutathione metabolic pathway in *Ophiocordyceps sinensis* blastospores under the treatments of naftifine hydrochloride

注：A，谷胱甘肽代谢途径示意图；B，与谷胱甘肽代谢相关基因的热图。颜色梯度从蓝色到白色再到红色，代表标准化后的基因表达水平从低到高。Note: A, Diagram of the glutathione metabolism pathway; B, Heatmap of genes related to glutathione metabolism. The color gradient from blue through white to red represented normalized gene expression level varies from low to high.

2.9 盐酸萘替芬诱导冬虫夏草菌的糖和脂类相关通路

GSEA结果显示，盐酸萘替芬处理冬虫夏草菌下调基因在糖酵解途径和TCA循环中显著富集（图8）。糖酵解途径包括丙酮酸脱氢酶（*DLAT*和*aceE*）和二氢硫辛酸脱氢酶（*DLD*），TCA循环包括柠檬酸合成酶（*CS*）和异柠檬酸脱氢酶（*IDH3*）、柠檬酸裂解酶（*ACLY*）、乌头酸盐水合酶（*ACO*）、α-酮戊二酸脱氢酶（*OGDH*）、延胡索酸水合酶（*fumA*）、苹果酸脱氢酶（*MDH1*）、丙酮酸羧化酶（*pyc*）、丙酮酸脱氢酶（*aceE*和*aceF*）等基因均为下调基因。TCA循环的两个关键限速酶：*CS*（$Log_2FC = -3.85$）和*IDH3*（$Log_2FC = -1.12$）均显著下调，而另一个关键限速酶α-酮戊二酸脱氢酶（*OGDH*，$Log_2FC = -0.49$）则表现出轻微下调。这些限速酶的下调可能导致TCA循环前半部分的中间产物更多地流向其他代谢途径。同时，琥珀酰辅酶A合成酶（*sucD*，$Log_2FC = 1.97$）和琥珀酸脱氢酶（*SDH1*，$Log_2FC = 1.62$）则显著上调表达。同时，乙醛酸循环中，异柠檬酸裂解酶（*ICL1*，$Log_2FC = 3.63$）和丙氨酸-乙醛酸转氨酶（*AGXT*，$Log_2FC = 1.20$）均显著上调，而甘氨酸羟甲基转移酶（*GLYA*，$Log_2FC = -2.06$）和甘氨酸脱氢酶（*GLDC*，$Log_2FC = -1.24$）则显著下调。此外，脂肪酸合成途径受到抑制，限速酶乙酰辅酶A羧化酶（*ACC*），以及将乙酰辅酶A转化为乙酰ACP的脂肪酸合成酶（*FAS*）均显著下调，同时，上调基因富集在脂肪酸分解代谢途径中，包括长链酰基辅酶A合成酶（*ACSL*），酰基辅酶A脱氢酶（*ACADM*），短链2甲基酰辅酶A脱氢酶（*ACADSB*）和乙酰辅酶A转移酶（*fadA*）均为上调基因。TCA循环和脂肪酸代谢的调控，说明能量供应的可能由糖类转变为脂质代谢提供能量以维持芽生孢子转化为菌丝生长所需能量。

2.10 盐酸萘替芬诱导冬虫夏草菌的的氧化磷酸化途径

氧化磷酸化途径通过线粒体内的电子传递链（复合体I-IV）将NADH和$FADH_2$提供的高能电子依次传递，最终将电子交给氧气，生成水，同时泵出质子在内膜内外形成质子梯度（Nolfi-Donegan *et al.*，2020）。GSEA分析发现（图8），在盐酸萘替芬处理3 d，氧化磷酸化途径中复合体I（NADH脱氢酶）相关基因大量下调，包括*Ndufs1*、*Ndufs2*、*Ndufs3*、*Ndufs4*、*Nudfs5*、*Ndufs8*、*Ndufv2*、*Ndufa2*、*Ndufb3*、*Ndufa5*、*Ndufa6*、*Ndufb7*、*Ndufa8*和*Ndufa9*等基因，复合体II（琥珀酸脱氢酶）中的*SDHA*、*SDHB*、*SDHC*、*SDHD*和复合体III中的*Cytb*等基因上调，而复合体IV包括*COX4*、*COX5A*、*COX5B*、*COX6A*、*COX6B*和*COX10*等基因则轻微下调。氧化磷酸化复合体I下调、复合体II上调，复合体III上调，暗示细胞正在进行代谢调整，以减少NADH依赖性，增强$FADH_2$的利用，从而通过复合体II和III提供替代电子流。这种响应可能适应了特定的环境胁迫或代谢需求，确保能量生成的效率，同时平衡氧化压力和电子流动态分配。

2.11 硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬诱导冬虫夏草菌二型态转换关键基因表达

真菌的二型态受到环境信号的严格调控，这些环境信号通过激活特定的信号转导途径来调节下游基因的表达，在白念珠菌*Candida albicans*菌丝生长过程中的作用尤为关键。研究较为深入的主要包括以下几条信号通路：Ras1-cAMP/PKA信号通路（如*Cyr1*、*Gpa2*、*Tpk1*、*Tpk2*、*Efg1*和*Flo8*等）、MAPK信号通路（如*Cdc24*、*Cst20*、*Ste11*、*Hst7*和*Cek1*等）、pH信号通路（如*Ptc2*、*Ssn3*和*Ume6*等）、N-乙酰氨基葡萄糖信号通路（如*Ngs1*和*Brg1*）以及法尼醇调控通路（如*Ubr1*、*Cup9*和*Sok1*等）。这些信号通路共同构成了白念珠菌响应外界环境刺激的复杂调控网络。

本研究筛选了冬虫夏草菌中上述途径的关键基因，并分析它们在硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬诱导下的表达情况（图9）。在W3 vs. K3组中，*Tpk2*（$Log_2FC = 1.27$）和*Phr1*（$Log_2FC = 1.03$）显著上调，而*Mep2*（$Log_2FC = -2.34$）和*Phr2*（$Log_2FC = -1.10$），则显著下调。同样，在D3 vs. N3组中，*Tpk2*（$Log_2FC = 3.63$）在该组中特异性上调，而*Mep2*（$Log_2FC = -1.82$）则显著下调。参与冬虫夏草菌芽生孢子-菌丝转变的DEGs主要与PKA和MAPK信号通路相关。通过PKA和MAPK途径调节丝状菌生长的关键因子*Mep2*在W3 vs. K3及D3 vs.N3组均显著下调。此外，PKA和MAPK的上游调节因子*Ras1*与*Cyr1*在所有试验组中的表达变化并不显著。这些发现可能表明，这些信号通路在硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬处理后冬虫夏草孢子向菌丝转变过程中的作用是有限的。

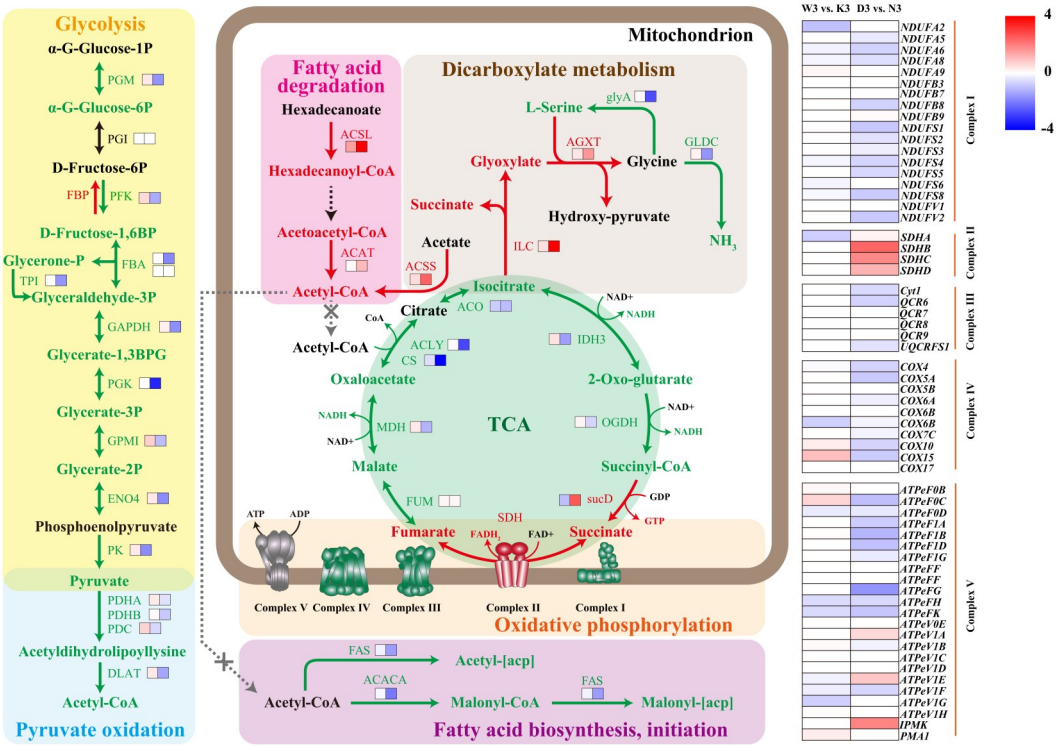

图8 盐酸萘替芬对体外培养冬虫夏草菌芽生孢子在碳水化合物、脂质及能量代谢方面的影响

Fig. 8 Effects of naftifine hydrochloride on carbohydrate, lipid, and energy metabolisms in the in vitro-culture *Ophiocordyceps sinensis* blastospore

注：Glycolysis，糖酵解；α-G-Glucose-1P，α-葡萄糖-1-磷酸α-G-Glucose-1-phosphate；α-G-Glucose-6P，α-葡萄糖-6-磷酸α-G-Glucose-6-phosphate；D-Fructose-6p，D-果糖-6-磷酸D-Fructose-6-phosphate；D-Fructose-1,6BP，D-果糖-1,6-二磷酸D-Fructose-1,6-bisphosphate；Glycerone-P，磷酸二羟丙酮Glycerone Phosphate；Glyceraldehyde-3P，甘油醛-3-磷酸Glyceraldehyde-3-phosphate；Glycerate-1,3BPG，1,3-二磷酸甘油酸Glycerate-1,3-bisphosphate；Glycerate-3P，3-磷酸甘油酸Glycerate-3-phosphate；Glycerate-2P，2-磷酸甘油酸Glycerate-2-phosphate；Phosphoenolpyruvate，磷酸烯醇式丙酮酸；pyruvate，丙酮酸；Acetyldihydrolipoyllysine，乙酰二氢硫辛酰赖氨酸；Acetyl-CoA，乙酰辅酶A；Pyruvate Oxidation，丙酮酸氧化；Fatty acid degradation，脂肪酸降解；Hexadecanoate，棕榈酸；Hexadecanoyl-CoA，棕榈酰辅酶A；Acetoacetyl-CoA，乙酰乙酰辅酶A；Mitochondrion，线粒体；Dicarboxylate metabolism，二羧酸代谢；L-Serine，L-丝氨酸；Glyoxylate，乙醛酸；Glycine，甘氨酸；Succinate，琥珀酸；Isocitrate，异柠檬酸；Citrate，柠檬酸；Oxaloacetate，草酰乙酸；Malate，苹果酸；Fumarate，延胡索酸；Succinyl-CoA，琥珀酰辅酶A；2-Oxo-glutarate，2-酮戊二酸；Complex I-V，复合体I-V；Oxidative phosphorylation，氧化磷酸化；Acetyl-[acp]，乙酰基-酰基载体蛋白复合物；Malonyl-CoA，丙二酰辅酶A；Malonyl-[acp]，丙二酰-酰基载体蛋白复合物；Fatty acid biosynthesis, initiation，脂肪酸生物合成的起始阶段。

结合Venn图分析结果，在W3 vs. K3组中，微管蛋白*TUB1*（$Log_2FC = 1.15$）、己糖激酶*HEX1*（$Log_2FC = 1.67$）和ABC转运蛋白*MDR4*（$Log_2FC = 1.83$）基因显著上调，而外流泵蛋白*DEP3*（$Log_2FC = -1.00$）和氨基肽酶Y *APE3*（$Log_2FC = -1.42$）基因显著下调。同样地，在D3 vs. N3组中，微管蛋白*TUB1*（$Log_2FC = 1.43$）、己糖激酶*HEX1*（$Log_2FC = 3.55$）和ABC转运蛋白*MDR4*（$Log_2FC = 2.44$）基因显著上调，而外流泵蛋白*DEP3*（$Log_2FC = -1.23$）和氨基肽酶Y *APE3*（$Log_2FC = -3.02$）基因显著下调。这些在两组比较中表现出一致差异表达趋势的基因，反映了两种药物的共同作用机制，并可能参与相同的生物过程。

此外，在W3 vs. K3组中，铁载体-铁转运体*sit1*（$Log_2FC = 1.25$）和磷酸盐通透酶*pho-4*（$Log_2FC = 1.20$）基因显著上调，而钠/钾-转运ATP酶*ATP12A*（$Log_2FC = -2.70$）、三价铁/铜离子还原酶跨膜组分2 *FRE2*（$Log_2FC = -2.13$）以及MFS转运蛋白*mfsB*（$Log_2FC = -1.31$）基因显著下调。相反，在D3 vs. N3组中，铁载体-铁转运体

sit1（$Log_2FC = -2.36$）和磷酸盐通透酶 pho-4（$Log_2FC = -1.95$）基因显著下调，而钠/钾-转运 ATP 酶 ATP12A（$Log_2FC = 4.54$）、三价铁/铜离子还原酶跨膜组分 2 FRE2（$Log_2FC = 4.46$）以及 MFS 转运蛋白 mfsB（$Log_2FC = 3.29$）基因显著上调。两组中差异表达趋势相反的基因揭示了两种药剂对冬虫夏草菌孢子发育的相反调控机制。

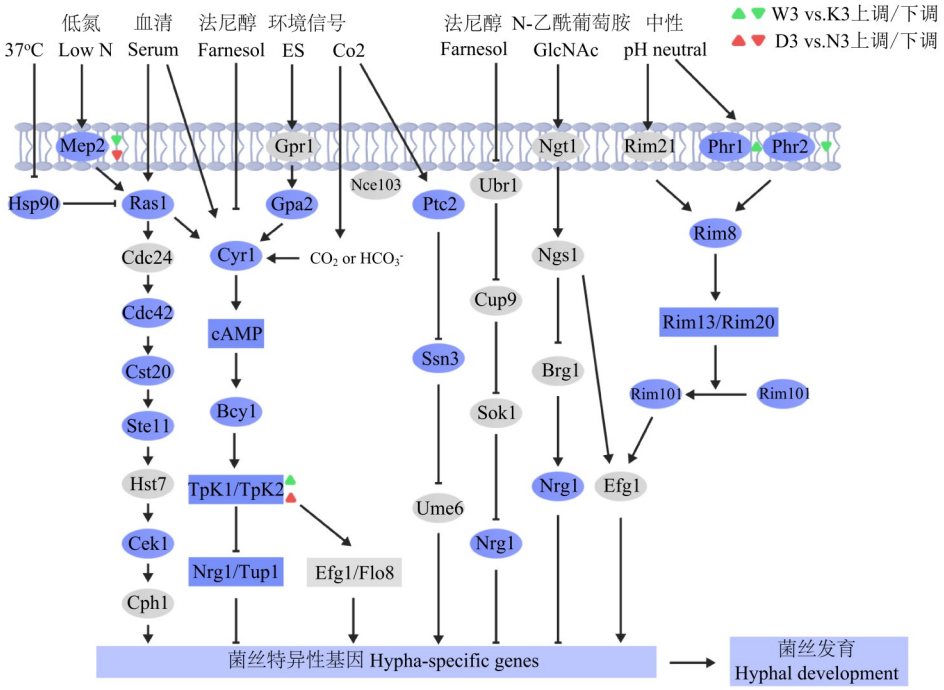

图 9　冬虫夏草菌二型态转换关键基因表达

Fig. 9　Expression of key genes in the dimorphic transition of *Ophiocordyceps sinensis*

注：该图在王天旭等（2020）和潘丽娜等（2016）研究成果中的通路图基础上进行了修改与整合。图中灰色背景基因表示冬虫夏草菌中未鉴定到的基因，蓝色背景表示冬虫夏草菌中存在的基因；△表示该基因在对应处理组中上调表达，▽表示下调表达；绿色代表 W3 vs. K3 的比较结果，红色代表 D3 vs. N3 的比较结果。Note: The figure was modified and synthesized based on pathways from the research results of Wang *et al*. (2020) and Pan *et al*. (2016). Gray indicated genes that were not identified in *O. sinensis*, while blue indicated genes identified. The upward triangle (△) represented up-regulated expression, and the downward triangle (▽) represented down-regulated expression. Green upward/downward triangles represented the differentially expressed genes from W3 vs. K3 comparison, while red triangles correspond to the D3 vs. N3 comparison.

2.12　qRT-PCR 验证

为了验证 RNA-seq 结果的真实性和可靠性，在表达差异最显著和功能富集结果中，随机选择了 26 个与应激反应、能量代谢、GSH、细胞生理过程、抗氧化和药物转运蛋白等相关的基因进行 qRT-PCR 验证。qRT-PCR 数据与 RNA-seq 结果显著相关，相关系数为 0.9238（D3 vs. N3）和 0.6589（W3 vs. K3）（图 10），证明了转录组结果的可信度。

3　结论与讨论

为满足市场需求，冬虫夏草的商业化人工培育模式已经成功建立（Li *et al*.，2016；韩日畴等，2019；Liu *et al*.，2020a）。然而，冬虫夏草人工培育周期较长，严重制约了其高效生产，关键因素在于冬虫夏草菌芽生孢子-菌丝转化的效率。本研究通过外源添加硫酸卡那霉素或盐酸萘替芬诱导芽生孢子，利用 RNA-seq 分析冬虫夏草菌芽生孢子-菌丝转化过程中的基因表达情况及相关通路，为阐明这一转化的分子机制提供理论依据。

转录组学在冬虫夏草菌研究中已得到广泛应用。李苗苗等（2024）的研究表明，冬虫夏草菌在寄主血腔内通过上调细胞壁相关基因、糖苷水解酶和热激蛋白等，重塑细胞壁结构并增强氧化应激防御能力，从而适应寄主环境。进一步研究发现，He 等（2024）揭示了冬虫夏草菌在水分胁

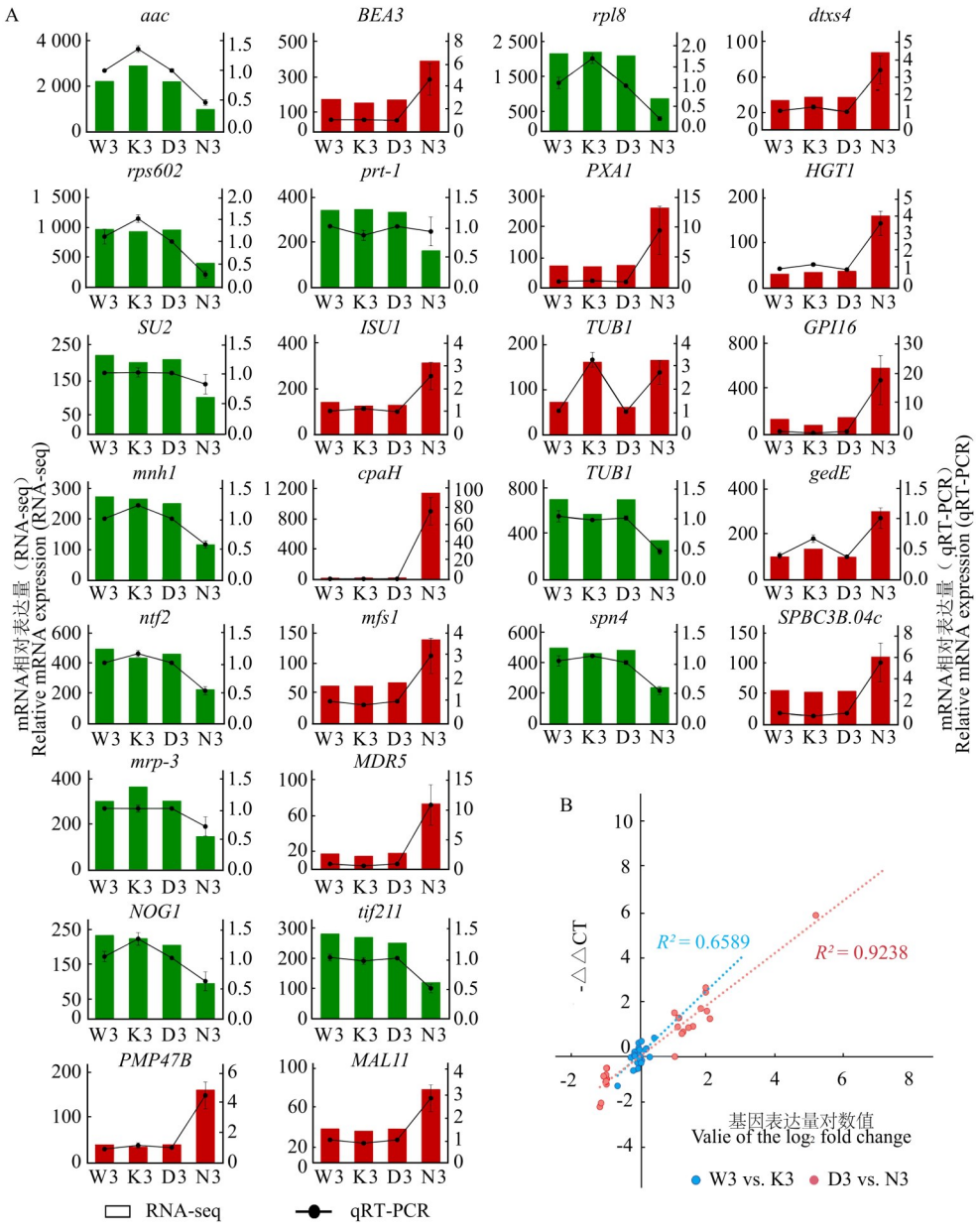

图10 qRT-PCR验证RNA-seq结果的可靠性

Fig. 10 Validation of RNA-seq results by qRT-PCR

注：A，qRT-PCR结果和RNA-seq数据的比较，所选基因来自差异表达最显著且功能富集的通路或者GSH基因集；B，qRT-PCR和RNA-seq数据的相关分析。其中横坐标为RNA-seq数据，纵坐标为qRT-PCR结果，蓝色圆形和红色圆形分别代表W3 vs. K3和D3 vs. N3。Note: A, Comparison between qRT-PCR results and RNA-seq data. The selected genes originated from the pathways featuring the most significant differential expression and functional enrichment or the GSH gene set; B, Correlation analysis of qRT-PCR and RNA-seq data. The abscissa represented RNA-seq data, and the ordinate indicated the qRT-PCR result. The blue circles and red circles respectively stood for W3 vs. K3 and D3 vs. N3 respectively.

迫下的耐受机制，鉴定出关键通路和上调基因，这些基因可能通过碳水化合物代谢和β-氧化途径协同提供能量，同时甜菜碱生物合成和酪氨酸代谢途径可能增强细胞渗透调节和抗氧化能力。此外，王靖逸（2024）发现蓝光抑制菌丝生长，而红光促进菌丝生长，且蓝光和红光处理均诱导黑色素积累，并激活抗氧化防御系统。具体而言，光处理可能通过调控酪氨酸代谢、谷胱甘肽代谢和过氧化物酶体代谢等途径，促进黑色素合成和增强抗氧化防御，揭示了冬虫夏草菌对光响应的

分子机制。

然而，目前关于外源化合物如何促进冬虫夏草菌二型态转变的分子机制研究较为有限，为深入探讨这一过程，本研究利用硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬分别处理冬虫夏草菌芽生孢子3 d，并进行转录组分析。结果表明，在硫酸卡那霉素处理后的芽生孢子中，上下调基因主要集中于碳水化合物代谢；而盐酸萘替芬处理后的芽生孢子，上调基因显著富集于谷胱甘肽水解相关途径、脂肪酸分解代谢和过氧化物酶体代谢途径。这些结果与上述研究结果吻合，表明这些通路相关基因的上调表达可能增强了冬虫夏草菌的抗氧化应激能力，以应对外源化合物所引发的环境压力。值得注意的是，盐酸萘替芬处理后，下调基因显著富集于糖酵解途径、TCA循环、脂肪酸合成、核糖体以及转录翻译等过程。基于这些发现，本研究推测，冬虫夏草菌芽生孢子可能通过调控能量代谢与资源重新分配，确保充足的能量供给与碳源用于细胞壁等结构的合成和重塑，以适应外源化合物所引起的环境变化，从而加快芽孢向菌丝的转化。

基于转录组分析结果，硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬于体外分别诱导冬虫夏草菌芽生孢子3 d，两者作用方式存在显著差异。硫酸卡那霉素主要影响糖代谢和氨基酸代谢途径，精氨酸、脯氨酸代谢以及淀粉、蔗糖和氨基糖、核苷酸糖等代谢途径的上调表达可能为菌丝转化提供了一定的能量与物质基础，但半乳糖、果糖及甘露糖代谢，以及糖酵解过程的下调则可能抑制了部分糖代谢和脂质代谢。因此，在处理芽生孢子3 d，硫酸卡那霉素可能未全面激活菌丝转化所需的多重代谢通路。相比之下，盐酸萘替芬通过广泛影响脂质代谢、GSH、TCA循环、过氧化物酶体功能以及蛋白质合成等多个过程，显著改变了芽生孢子的代谢状态，从而更有效地促进了其转化。过氧化物酶体在脂质分解和抗氧化反应中发挥着关键作用（Lodhi *et al.*，2014；He *et al.*，2021）。通过GSEA分析，盐酸萘替芬对过氧化物酶体功能的显著激活被认为是其高效作用的重要因素，可能为菌丝转化提供充足的能量与中间产物。

白色念珠菌的形态转换受到多种保守信号通路的精密调控，其中Ras-cAMP/PKA信号通路和MAPK信号通路在真核生物中高度保守，在白念珠菌和酿酒酵母的形态转换及侵染生长中发挥关键作用（潘丽娜等，2016；王天旭等，2020）。Ras-cAMP/PKA信号通路通过调控细胞内cAMP水平和PKA活性，影响菌丝生长和形态转换；而Ste11-Hst7-Cek1/Cek2介导的MAPK信号通路不仅在酿酒酵母中调控交配和菌丝生长，也在白念珠菌中参与形态转换和侵染过程的调控（Roberts *et al.*，1994；Köhler *et al.*，1996；Leberer *et al.*，1996；Chen *et al.*，2002；Magee *et al.*，2002；Bennett *et al.*，2005；Hogan *et al.*，2009；Ramirez-Zavala *et al.*，2013；Liang *et al.*，2020）。此外，Rim101介导的pH感应途径通过响应环境pH变化，调控转录因子*Rim101*的活性，从而影响菌丝生长。*Rim101*的活性依赖于*Rim8*、*Rim13*和*Rim20*等因子的调控，且在碱性条件下特异性表达（Davis *et al.*，2000a，2000b；El Barkani *et al.*，2000；Li *et al.*，2004；Kullas *et al.*，2004；Du *et al.*，2016；Shimasawa *et al.*，2023）。*Rim101*基因敲除能显著抑制菌丝生长，进一步表明该通路在形态转换中的重要性。然而，在硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬诱导下，冬虫夏草菌的相关基因未呈现明显的响应。这意味着冬虫夏草菌可能拥有一个独特的基因网络来控制其形态转变。

此外，*Tpk2*、*Mep2*、*Ras1*和*Cyr1*等基因与菌丝生长密切相关。在盐酸萘替芬的作用下，*Tpk2*的显著上调可能通过增强Ras1-cAMP/PKA信号通路的活性，促进菌丝形成（Yu *et al.*，2022）。同时，*Mep2*的显著下调可能削弱其对铵浓度的感知和响应能力，从而降低对菌丝生长的促进作用（Boeckstaens *et al.*，2007；Brito *et al.*，2020）。此外，由于*Ras1*和*Cyr1*的表达变化不显著，推测冬虫夏草菌在盐酸萘替芬的作用下可能不依赖cAMP/PKA信号通路调控菌丝生长（Piispanen *et al.*，2011；Ng *et al.*，2023）。

真菌孢子发育和形态转变过程往往伴随着活性氧（ROS）水平动态波动（Wang *et al.*，2020）。因此抗氧化能力对于真菌芽生孢子生长和发育尤为重要，而抗氧化小分子GSH可有效地清除胞内积累过多的ROS。本研究发现，经盐酸萘替芬处理的冬虫夏草菌芽生孢子3 d，GSH代谢途径核心基因呈现显著激活特征。有研究表明，GST催化GSH和亲电化合物（RX）通过巯基（-SH）结合生成R-S-GSH，这种水溶性代谢物（R-S-GSH）

能有效地排出细胞（Wang *et al.*，2009；Cui *et al.*，2020；Wang *et al.*，2021），构成真菌解毒的重要分子基础。值得注意的是，在冬虫夏草菌中，盐酸萘替芬处理显著上调了*GST*，*GGT*和*DUG1*基因协同上调表达，可能通过三重调控机制强化抗氧化防御。这种多靶点抗氧化网络的激活，或可解释处理组菌丝生长速率提升的生物学现象（Sedlak *et al.*，2019；Asanuma *et al.*，2021）。

乙酰辅酶A（Acetyl-CoA）是细胞代谢的核心中间产物，具有多重作用。其来源主要包括丙酮酸转化，醋酸盐的代谢，以及脂肪酸的β-氧化（Reed，2001；Chew *et al.*，2019；Dikalov *et al.*，2024）。GSEA结果显示，在盐酸萘替芬的作用下，下调基因在糖酵解途径中显著富集，介导丙酮酸转化为乙酸辅酶A的丙酮酸脱氢酶（PDH）显著下调。同时，脂肪酸β-氧化中将乙酰乙酰辅酶A分解为乙酰辅酶A的乙酰辅酶A酰基转移酶（fadA）和将醋酸盐转化为乙酰辅酶A的乙酰辅酶A合成酶（ACS）均显著上调，说明在盐酸萘替芬的作用下，冬虫夏草菌的乙酰辅酶A主要由脂肪酸和醋酸盐转化，而并非来自糖类（Behal *et al.*，2002；Campbell *et al.*，2003；Kaplon *et al.*，2013）。此外，下调基因在TCA循环中显著富集，三个限速酶基因*CS*、*IDH3*和*OGDH*均下调表达，说明TCA循环的前半部分受到抑制，乙酰辅酶A进入TCA通量降低，部分代谢中间产物可能被分配到其他代谢途径（Armstrong *et al.*，2014；Choi *et al.*，2021；Nishii *et al.*，2023；Ivanov *et al.*，2024）。同时，脂肪酸合成的限速酶乙酰辅酶A羧化酶（ACC），以及将乙酰辅酶A转化为乙酰ACP的脂肪酸合成酶（FAS）均显著下调，说明脂肪酸合成通路受到抑制，乙酰辅酶A并非流向脂肪酸合成，而是参与其他代谢活动（Baud *et al.*，2003；Günenc *et al.*，2022）。异柠檬酸裂解酶（ICL1）能够催化异柠檬酸裂解成乙醛酸和琥珀酸，*ICL1*基因的显著上调和*IDH3*的显著下调，暗示中间产物异柠檬酸可能进入乙醛酸盐代谢途径。同时，催化乙醛酸盐转化为甘氨酸的丙氨酸-乙醛酸转氨酶（AGXT）基因显著上调，而催化甘氨酸释放氨基或转变成丝氨酸的甘氨酸羟甲基转移酶（GLYA）和甘氨酸脱氢酶（GLDC）则显著下调，暗示甘氨酸水平可能在细胞内有所上升（Gould *et al.*，2006；Pey *et al.*，2013；De Benedetti *et al.*，2014；Chen *et al.*，2023）。可见，异柠檬酸可能通过转变为甘氨酸和琥珀酸，为TCA后半通路和复合体II提供琥珀酸。TCA循环前半部分的抑制导致NADH生成量下降，这可能降低通过复合体I驱动的氧化磷酸化效率，进而影响ATP的生成。然而，琥珀酰辅酶A合成酶（sucD）和琥珀酸脱氢酶（SDH1）显著上调表达，前者在催化琥珀酰辅酶A转化为琥珀酸的过程中通过底物磷酸化直接释放ATP，而后者则在高浓度琥珀酸（异柠檬酸裂解和琥珀酰辅酶A转化）的条件下，催化琥珀酸转化为延胡索酸并释放出$FADH_2$，进入复合体II驱动氧化磷酸化生成ATP（Cao *et al.*，2023；Pfister *et al.*，2023）。

对应地，在氧化磷酸化途径中，复合体I相关基因（如*Ndufs1*，*Ndufs2*，*Ndufs3*，*Ndufs5*和*Ndufs8*等）大部分呈现下调趋势，而复合体II的全部基因（如*SDHA*，*SDHB*，*SDHC*和*SDHD*等），以及复合体III的*Cytb*等基因则呈现上调趋势。这表明在盐酸萘替芬处理后的冬虫夏草菌可能主要以$FADH_2$通过复合体II和III，而不是NADH通过复合体I驱动氧化磷酸化生成ATP（Zhao *et al.*，2019；Nolfi-Donegan *et al.*，2020）。可见，上述基因的差异调控可能暗示孢子在盐酸萘替芬的作用下，代谢中间产物和能量生成方式发生了重新分配。TCA循环的前半部分受到抑制，更倾向于后半部分的活性。TCA循环前半部分的代谢中间产物如乙酰辅酶A和异柠檬酸等可能被分流到其他代谢途径，如乙醛酸盐代谢途径或其他次生代谢产物的合成，用于结构分子的合成；而由于TCA循环前半部分的NADH减少（复合体I效率下降）导致的ATP生成量降低，则由TCA循环后半部分底物磷酸化和$FADH_2$驱动（复合体II和III效率增加）的氧化磷酸化路径的来补充（Zhao *et al.*，2019；Nolfi-Donegan *et al.*，2020）。综上所述，冬虫夏草菌在盐酸萘替芬处理后，通过调整TCA循环、脂肪酸代谢、乙醛酸盐代谢和氧化磷酸化相关途径实现对碳流和能量代谢的重新分配，这样既能够确保足够能量的供应，满足孢子在形态转变和快速生长的能量需求，又能避免乙酰辅酶A彻底氧化成二氧化碳造成碳源流失。

蛋白质翻译是一个高度能量消耗的过程，而核糖体的合成和维持则是细胞代谢中最具资源密集性的环节之一（Jia *et al.*，2024；Martín-

Villanueva *et al.*，2024）。GSEA结果显示，在盐酸萘替芬的作用下，下调基因在冬虫夏草菌孢子的核糖体结构和翻译过程相关基因集中显著富集。翻译起始相关的下调基因共114个（包含部分核糖体基因），包括*CRP-6*、*CRP-7*、*CRP-15*、*CRP-28*、*CRP-46*、*CRP-63*、*CRP-74*、*EIF2B3*、*EIF3H*、*TIF-1*、*TIF211*、*TIF212*、*TIF32*、*TIF-34*和*NIP-1*等基因。核糖体相关下调基因共122个，包括*RPL-11*、*RPL-12*、*RPL-13*、*RPL-15*、*RPL-17*、*RPS11A*、*RPS12*、*RPS13*、*RPS-14*、*RPS15*、*RPS16*和*RPS-17*等基因。这种现象可能反映了细胞在孢子向菌丝形态转变过程中，为应对复杂的形态和代谢重构需求而采取的优先级调整策略。孢子阶段本身具有静态性特征，细胞内已储存了足够的核糖体和mRNA，为孢子的初始萌发提供所需的分子资源。在孢子萌发早期，这些储备分子可以通过降解释放氨基酸和能量，用于细胞壁重组、细胞体积增大和极性生长的启动。此时，减少新核糖的合成和蛋白质的翻译，既节约了能量，又为细胞分配资源以满足形态变化提供了条件。这一资源优化机制可能是孢子阶段适应环境变化和启动形态转变的重要策略。由此可见，核糖体结构和翻译过程相关基因受到抑制，结合上述TCA循环，脂肪酸代谢和乙醛酸盐代谢等途径的调控，说明在芽生孢子向菌丝转化过程中的整体代谢模式呈现出一种特定的重分配状态，减少高能耗和碳损耗过程，为形态变化和细胞适应性提供充足的能量和结构分子支持。这一过程可能是孢子向菌丝形态转变过程中适应环境胁迫的重要机制。

本研究探讨了冬虫夏草菌在硫酸卡那霉素和盐酸萘替芬处理下的基因表达响应。基于高通量RNA-seq和qRT-PCR技术，为系统分析两种化合物在促进冬虫夏草菌芽生孢子转化为菌丝过程中的作用机制提供了重要数据支持。在硫酸卡那霉素处理芽生孢子3 d的上下调基因主要富集于碳水化合物代谢；盐酸萘替芬处理芽生孢子3 d的上调基因主要富集于谷胱甘肽通路、脂肪酸分解和过氧化物酶体等通路；下调基因显著富集于糖酵解、TCA循环、脂肪酸合成、核糖体和转录翻译等相关途径。研究结果揭示了外源化合物在调控冬虫夏草菌二型态转变过程中的分子机制及为提升冬虫夏草人工培育效率提供新思路。

参考文献（References）

Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi – a review [J]. *Medical Mycology*, 2012, 50 (4): 337–345.

Armstrong CT, Anderson JLR, Denton RM. Studies on the regulation of the human E1 subunit of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, including the identification of a novel calcium-binding site [J]. *The Biochemical Journal*, 2014, 459 (2): 369–381.

Asanuma M, Miyazaki I. Glutathione and related molecules in parkinsonism [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (16): 8689.

Baral B. Entomopathogenicity and biological attributes of himalayan treasured fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Yarsagumba) [J]. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 2017, 3 (1): 4.

Bastidas RJ, Heitman J. Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106 (2): 351–352.

Baud S, Guyon V, Kronenberger J, *et al*. Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2003, 33 (1): 75–86.

Behal RH, Lin M, Back S, *et al*. Role of acetyl-coenzyme a synthetase in leaves of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 402 (2): 259–267.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing [J]. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* (*Methodological*), 1995, 57 (1): 289–300.

Bennett RJ, Johnson AD. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2005, 59: 233–255.

Berrocal A, Navarrete J, Oviedo C, *et al*. Quorum sensing activity in *Ophiostoma ulmi*: Effects of fusel oils and branched chain amino acids on yeast-mycelial dimorphism [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113 (1): 126–134.

Boeckstaens M, André B, Marini AM. The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium [J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 64 (2): 534–546.

Brito AS, Neuhäuser B, Wintjens R, *et al*. Yeast filamentation signaling is connected to a specific substrate translocation mechanism of the Mep2 transceptor [J]. *PLoS Genetics*, 2020, 16 (2): e1008634.

Campbell JW, Morgan-Kiss RM, Cronan JE. A new *Escherichia coli* metabolic competency: Growth on fatty acids by a novel anaerobic beta-oxidation pathway [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 47 (3): 793–805.

Cao K, Xu J, Cao W, *et al*. Assembly of mitochondrial succinate dehydrogenase in human health and disease [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2023, 207: 247–259.

Chai W, Mao X, Li C, *et al*. Mannitol mediates the mummification

behavior of *Thitarodes xiaojinensis* larvae infected with *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024a, 15.

Chai W, Mao X, Li C, *et al*. Neurotransmitter acetylcholine mediates the mummification of *Ophiocordyceps sinensis* - infected *Thitarodes xiaojinensis* larvae [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024b, 90 (9): e0033324.

Chaves AFA, Navarro MV, Castilho DG, *et al*. A conserved dimorphism-regulating histidine kinase controls the dimorphic switching in *Paracoccidioides brasiliensis* [J]. *Fems Yeast Research*, 2016, 16 (5): fow47.

Chen J, Chen J, Lane S, *et al*. A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans* [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 46 (5): 1335-1344.

Chen M, Xiao Z, Huang Z, *et al*. Glycine Decarboxylase (GLDC) plays a crucial role in regulating energy metabolism, Invasion, metastasis and immune escape for prostate cancer [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2023, 19 (15): 4726-4743.

Chen S. Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp [J]. *Imeta*, 2023, 2 (2): e107.

Chew SY, Chee WJY, Than LTL. The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2019, 26 (1): 52.

Choi I, Son H, Baek J. Tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates: regulators of immune responses [J]. *Life*, 2021, 11 (1): 69.

Cui J, Li G, Yin J, *et al*. GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling (review) [J]. *International Journal of Oncology*, 2020, 56 (4): 867-878.

Davis D, Edwards JE, Mitchell A P, *et al*. *Candida albicans RIM101* pH response pathway is required for host-pathogen interactions [J]. *Infection and Immunity*, 2000a, 68 (10): 5953-5959.

Davis D, Wilson RB, Mitchell AP. *RIM101*-dependent and -independent pathways govern pH responses in *Candida albicans* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000b, 20 (3): 971-978.

De Benedetti S, Bühl H, Gaballah A, *et al*. Characterization of serine hydroxymethyltransferase GlyA as a potential source of D-alanine in *Chlamydia pneumoniae* [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 19.

Dikalov S, Panov A, Dikalova A. Critical role of mitochondrial fatty acid metabolism in normal cell function and pathological conditions [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25 (12): 6498.

Du H, Huang G. Environmental pH adaption and morphological transitions in *Candida albicans* [J]. *Current Genetics*, 2016, 62 (2): 283-286.

El Barkani A, Kurzai O, Fonzi WA, *et al*. Dominant active alleles of *RIM101* (*PRR2*) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20 (13): 4635-4647.

Gao X, Zhang J, Wu P, *et al*. Conceptual framework for the insect metamorphosis from larvae to pupae by transcriptomic profiling, a case study of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *BMC Genomics*, 2022, 23 (1): 591.

Gómez-Gil E, Franco A, Madrid M, *et al*. Quorum sensing and stress-activated MAPK signaling repress yeast to hypha transition in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus* [J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15 (5): e1008192.

Gould TA, van de Langemheen H, Muñoz-Elías EJ, *et al*. Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 61 (4): 940-947.

Günenc AN, Graf B, Stark H, *et al*. Fatty acid synthase: Structure, function, and regulation [J]. *Subcellular Biochemistry*, 2022, 99: 1-33.

Gupta AK, Ryder JE, Cooper EA. Naftifine: A review [J]. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 2008, 12 (2): 51-58.

Han RC, Wu H, Tao HP, *et al*. Research on Chinese cordyceps during the past 70 years in China [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (5): 849-883. [韩日畴, 吴华, 陶海平, 等. 中国冬虫夏草研发70年 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 569 (5): 849-883]

He A, Dean JM, Lodhi IJ. Peroxisomes as cellular adaptors to metabolic and environmental stress [J]. *Trends in Cell Biology*, 2021, 31 (8): 656-670.

He L, Li C, Chen Z, *et al*. Combined metabolome and transcriptome analysis reveal the mechanism of water stress in *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25 (1): 112934.

He M, Wang T, Tang C, *et al*. Metabolomics and transcriptomics reveal the effects of different fermentation times on antioxidant activities of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Journal of Fungi*, 2025, 11 (1): 51.

Hogan DA, Sundstrom P. The Ras/cAMP/PKA signaling pathway and virulence in *Candida albicans* [J]. *Future Microbiology*, 2009, 4 (10): 1263-1270.

Holliday JC, Cleaver MP. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) link (ascomycetes). A review [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2008, 10 (3): 219-234.

Ivanov S, Nano O, Hana C, *et al*. Molecular targeting of the isocitrate dehydrogenase pathway and the implications for cancer therapy [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25 (13): 7337.

Jia X, He X, Huang C, *et al*. Protein translation: Biological processes and therapeutic strategies for human diseases [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9: 44.

Jürgensen CW, Jacobsen NR, Emri T, *et al*. Glutathione metabolism and dimorphism in *Aureobasidium pullulans* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2001, 41 (2): 131-137.

Kaplon J, Zheng L, Meissl K, *et al*. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence [J]. *Nature*, 2013, 498 (7452): 109-112.

Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nature Methods*, 2015, 12 (4): 357-360.

Köhler JR, Fink GR. *Candida albicans* strains heterozygous and

homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93 (23): 13223-13228.

Kullas AL, Li M, Davis DA. Snf7p, a component of the ESCRT-III protein complex, is an upstream member of the *RIM101* pathway in *Candida albicans* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3 (6): 1609-1618.

Leberer E, Harcus D, Broadbent ID, *et al*. Signal transduction through homologs of the ste20p and ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93 (23): 13217-13222.

Li B, Dewey CN. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.

Li MM, Meng Q, Zhang JH. Transcriptome analyses of *Ophiocordyceps sinensis* blastospores developed *in vitro* and in hemocoel of host ghost moth [J]. *Mycosystem*, 2024, 43 (10): 95-106. [李苗苗, 孟茜, 张继红. 冬虫夏草菌芽生孢子体外及寄主蝠蛾血腔内发育的转录组分析 [J]. 菌物学报, 2024, 43 (10): 95-106]

Li M, Martin SJ, Bruno VM, *et al*. *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs [J]. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3 (3): 741-751.

Li M, Meng Q, Zhang H, *et al*. Changes in transcriptomic and metabolomic profiles of morphotypes of *Ophiocordyceps sinensis* within the hemocoel of its host larvae, *Thitarodes xiaojinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21 (1): 789.

Li X, Liu Q, Li W, *et al*. A breakthrough in the artificial cultivation of Chinese cordyceps on a large-scale and its impact on science, the economy, and industry [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2019, 39 (2): 181-191.

Li Y, Hsiang T, Yang R, *et al*. Comparison of different sequencing and assembly strategies for a repeat-rich fungal genome, *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 128: 1-6.

Li Y, Li X, Yao Y, *et al*. Differential coexistence of multiple genotypes of *Ophiocordyceps sinensis* in the stromata, ascocarps and ascospores of natural *Cordyceps sinensis* [J]. *PLoS ONE*, 2023, 18 (3): e270776.

Liang W, Guan G, Li C, *et al*. Genetic regulation of the development of mating projections in *Candida albicans* [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9 (1): 413-426.

Liu G, Cao L, Qiu X, *et al*. Quorum sensing activity and hyphal growth by external stimuli in the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Insects*, 2020a, 11 (4): 205.

Liu G, Cao L, Rao Z, *et al*. Identification of the genes involved in growth characters of medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis* based on *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020b, 104 (6): 2663-2674.

Liu G, Han R, Cao L. Artificial cultivation of the Chinese cordyceps from injected ghost moth larvae [J]. *Environmental Entomology*, 2019, 48 (5): 1088-1094.

Liu G, Qiu X, Cao L, *et al*. Scratching stimuli of mycelia influence fruiting body production and ROS-scavenging gene expression of *Cordyceps militaris* [J]. *Mycobiology*, 2018, 46 (4): 382-387.

Liu Y, Li Q, Li L, *et al*. Immunostimulatory effects of the intracellular polysaccharides isolated from liquid culture of *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes) on RAW264.7 cells *via* the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 275: 114130.

Liu Y, Wang J, Wang W, *et al*. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis* [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: *Ecam*, 2015: 575063.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods* (*San Diego, Calif.*), 2001, 25 (4): 402-408.

Lo H, Hsieh C, Lin F, *et al*. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in dong-chong xia cao (Dōng Chóng Xià Cǎo) and related bioactive ingredients [J]. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2013, 3 (1): 16-32.

Lodhi IJ, Semenkovich CF. Peroxisomes: A nexus for lipid metabolism and cellular signaling [J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19 (3): 380-392.

Magee BB, Legrand M, Alarco A, *et al*. Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans* [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 46 (5): 1345-1351.

Marines HM, Osato MS, Font RL. The value of calcofluor white in the diagnosis of mycotic and *Acanthamoeba* infections of the eye and ocular adnexa [J]. *Ophthalmology*, 1987, 94 (1): 23-26.

Martín-Villanueva S, Galmozzi CV, Ruger-Herreros C, *et al*. The beak of eukaryotic ribosomes: Life, work and miracles [J]. *Biomolecules*, 2024, 14 (7): 882.

Meng Q, Yu H, Zhang H, *et al*. Transcriptomic insight into the immune defenses in the ghost moth, *Hepialus xiaojinensis*, during an *Ophiocordyceps sinensis* fungal infection [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 64: 1-15.

Naseem S, Gunasekera A, Araya E, *et al*. *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) induction of hyphal morphogenesis and transcriptional responses in *Candida albicans* are not dependent on its metabolism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (33): 28671-28680.

Ng AWR, Li L, Ng EWL, *et al*. Molecular docking reveals critical residues in *Candida albicans* Cyr1 for peptidoglycan recognition and hyphal growth [J]. *Acs Infectious Diseases*, 2023, 9 (7): 1362-1371.

Nishii M, Ito S, Osanai T. Citrate synthase from *Cyanidioschyzon merolae* exhibits high oxaloacetate and acetyl-CoA catalytic efficiency [J]. *Plant Molecular Biology*, 2023, 111 (4-5): 429-438.

Nolfi-Donegan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement [J]. *Redox Biology*, 2020, 37: 101674.

Pan LN, Cao CJ, Wei YJ, *et al*. Phenotypic transitions and their

regulatory mechanisms in the human fungal pathogen *Candida albicans* [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2016, 38 (9): 1049-1059. [潘丽娜, 曹承俊, 魏羽佳, 等. 白念珠菌形态转换及其调控机制的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38 (9): 1049-1059]

Paterson RRM. *Cordyceps* - a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69 (7): 1469-1495.

Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, *et al*. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33 (3): 290-295.

Pey AL, Albert A, Salido E. Protein homeostasis defects of alanine-glyoxylate aminotransferase: New therapeutic strategies in primary hyperoxaluria type I [J]. *Biomed Research International*, 2013: 687658.

Pfister P, Diehl C, Hammarlund E, *et al*. Enhancing the substrate specificity of *Clostridium* succinyl-CoA reductase for synthetic biology and biocatalysis [J]. *Biochemistry*, 2023, 62 (11): 1786-1793.

Piispanen AE, Bonnefoi O, Carden S, *et al*. Roles of Ras1 membrane localization during *Candida albicans* hyphal growth and farnesol response [J]. *Eukaryotic Cell*, 2011, 10 (11): 1473-1484.

Poudyal N, Subedi YP, Shakespear M, *et al*. Synthesis of kanamycin-azole hybrids and investigation of their antifungal activities [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2024, 114: 117947.

Pouliot M, Pyakurel D, Smith-Hall C. High altitude organic gold: The production network for *Ophiocordyceps sinensis* from far-western Nepal [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 218: 59-68.

Qin Q, Zhou G, Zhang H, *et al*. Obstacles and approaches in artificial cultivation of Chinese cordyceps [J]. *Mycology*, 2018, 9 (1): 7-9.

Ramirez-Zavala B, Weyler M, Gildor T, *et al*. Activation of the Cph1-dependent MAP kinase signaling pathway induces white-opaque switching in *Candida albicans* [J]. *Plos Pathog*, 2013, 9 (10): e1003696.

Rao Z, Cao L, Wu H, *et al*. Comparative transcriptome analysis of *Thitarodes armoricanus* in response to the entomopathogenic fungi *Paecilomyces Hepiali* and *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Insects*, 2019, 11 (1): 4.

Reed LJ. A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (42): 38329-38336.

Roberts RL, Fink GR. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: Mating and invasive growth [J]. *Genes & Development*, 1994, 8 (24): 2974-2985.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. EdgeR: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. *Bioinformatics* (*Oxford*, *England*), 2010, 26 (1): 139-140.

Sedlak TW, Paul BD, Parker GM, *et al*. The glutathione cycle shapes synaptic glutamate activity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116 (7): 2701-2706.

Shimasawa M, Sakamaki J, Maeda T, *et al*. The pH-sensing Rim101 pathway regulates cell size in budding yeast [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299 (3): 102973.

Shrestha UB, Bawa KS. Economic contribution of Chinese caterpillar fungus to the livelihoods of mountain communities in Nepal [J]. *Biological Conservation*, 2014, 177: 194-202.

Su C, Yu J, Lu Y. Hyphal development in *Candida albicans* from different cell states [J]. *Current Genetics*, 2018, 64 (6): 1239-1243.

Subedi YP, AlFindee MN, Takemoto JY, *et al*. Antifungal amphiphilic kanamycins: New life for an old drug [J]. *Medchemcomm*, 2018, 9 (6): 909-919.

Sun T, Jin Y, Rao Z, *et al*. Knockdown of *Thitarodes* host genes influences dimorphic transition of *Ophiocordyceps sinensis* in the host hemolymph [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2024, 14: 1451628.

Sung G, Hywel-Jones NL, Sung J, *et al*. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi [J]. *Studies in Mycology*, 2007, 57: 5-59.

Tong C, Wei J, Mao X, *et al*. Stable reference gene selection for *Ophiocordyceps sinensis* gene expression studies under different developmental stages and light-induced conditions [J]. *PLoS ONE*, 2023, 18 (4): e284486.

Trapnell C, Roberts A, Goff L, *et al*. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with tophat and cufflinks [J]. *Nature Protocols*, 2012, 7 (3): 562-578.

Wang H, Sun S, Ge W, *et al*. Horizontal gene transfer of *Fhb7* from fungus underlies *Fusarium* head blight resistance in wheat [J]. *Science* (*New York, N.Y.*), 2020, 368 (6493): eaba5435.

Wang JY. Effect of Blue Light and Red Light on the Growth of *Cordyceps sinensis* [D]. Lanzhou: Lanzhou Jiaotong University Master Thesis, 2024. [王靖逸. 蓝光和红光对冬虫夏草菌生长的影响 [D]. 兰州: 兰州交通大学硕士论文, 2024]

Wang Q, Bin C, Xue Q, *et al*. GSTZ1 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib-induced ferroptosis via inhibition of NRF2/GPX4 axis [J]. *Cell Death and Disease*, 2021, 12 (5): 426.

Wang TX, Yang DD, Sun X, *et al*. Dimorphism in *Candida albicans*: from commensal to pathogen [J].*Mycosystema*, 2020, 39 (11): 2003-2013. [王天旭, 杨丹丹, 孙洵, 等. 白念珠菌的二型性转换：从共生菌到致病菌 [J] 菌物学报, 2020, 39 (11): 2003-2013]

Wang X, Zhang Z, Perrett S. Characterization of the activity and folding of the glutathione transferase from *Escherichia coli* and the roles of residues Cys^{10} and His^{106} [J]. *Biochemical Journal*, 2009, 417 (1): 55-64.

Wong KL, So EC, Chen CC, *et al*. Regulation of steroidogenesis by *Cordyceps sinensis* mycelium extracted fractions with (hCG) treatment in mouse leydig cells [J]. *Archives of Andrology*, 2007, 53 (2): 75-77.

Wu H, Cao L, He M, *et al*. Interspecific hybridization and complete mitochondrial genome analysis of two ghost moth species [J].

Insects, 2021, 12 (11): 1046.

Wu H, Rao Z, Cao L, *et al*. Infection of *Ophiocordyceps sinensis* fungus causes dramatic changes in the microbiota of its *Thitarodes* host [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 577268.

Wu P, Qin Q, Zhang J, *et al*. The invasion process of the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps sinensis* into the larvae of ghost moths (*Thitarodes xiaojinensis*) using a GFP-labeled strain [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 974323.

Yu Q, Gong X, Tong Y, *et al*. Phosphorylation of Jhd2 by the Ras-cAMP-PKA(Tpk2) pathway regulates histone modifications and autophagy [J]. *Nature Communications*, 2022, 13 (1): 5675.

Yue K, Ye M, Lin X, *et al*. The artificial cultivation of medicinal caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes): A review [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2013a, 15 (5): 425-434.

Yue K, Ye M, Zhou Z, *et al*. The genus *Cordyceps*: A chemical and pharmacological review [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013b, 65 (4): 474-493.

Zhao R, Jiang S, Zhang L, *et al*. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 44 (1): 3-15.

Zhou X, Li L, Tian E. Advances in research of the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* in China [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2014, 34 (3): 233-243.