

猪苓菌丝形成菌核的 MAPK 基因克隆及表达分析

刘蒙蒙 宋超 邢咏梅 郭顺星*

(北京协和医学院 中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)

摘要:【目的】克隆药用真菌猪苓 MAPK 基因并进行生物信息学分析及表达模式研究。【方法】利用 5'-RACE-PCR 技术从猪苓菌丝中克隆得到 MAPK 基因全长, 利用生物信息学软件推测蛋白的理化性质、结构域; DNA Star 对氨基酸进行多序列比对; 用 MEGA 5.0 做进化关系分析; 借助实时定量 PCR 检测基因表达模式。【结果】猪苓 MAPK 基因的全长 cDNA 为 1 293 bp, 其中编码区占 1 161 bp, 共编码 386 个氨基酸, 推测分子量为 43.872 kD, 理论等电点为 6.68。猪苓的 MAPK 有 MAPK 中 ERK1/2 类型的保守区。系统进化树结果显示猪苓 MAPK 蛋白属于担子菌类群。实时荧光定量 PCR 分析结果表明猪苓菌核形成初期, 菌核中的 MAPK 表达量显著高于菌丝组织, 随着菌核的快速生长而减少。【结论】猪苓 MAPK 基因 *PuMAPK* 的分子特征为进一步研究其在猪苓菌丝形成菌核过程中的作用奠定基础。

关键词: 猪苓, MAPK 基因, 5'-RACE, 实时荧光定量 PCR, 菌核形成

Molecular cloning and characterization of a MAPK gene from *Polyporus umbellatus*

LIU Meng-Meng SONG Chao XING Yong-Mei GUO Shun-Xing*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: [Objective] To clone the mitogen-activated protein kinase (MAPK) gene from *Polyporus umbellatus* and carry out the bioinformatics and expression mode analysis. [Methods] RACE technology was carried out to clone the full length cDNA of MAPK gene. The characteristics of physicochemical properties and conserved domains of the predicted MAPK protein were determined using bioinformatics tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using BioEditor and MEGA 5.0 software. Real time quantitative PCR was used for gene expression analysis. [Results] The full length cDNA of MAPK was 1 293 bp in length and encoded a 386-aa protein with a molecular weight of 43.872 kD and an isoelectric point (pI) of 6.68. The PuMAPK clustered with Basidiomycete group according to the phylogenetic analysis. Real time quantitative PCR (qPCR) analysis revealed that transcripts were the most abundant in the beginning of sclerotial formation (20–30 days) with 7.86 fold over that in the mycelium, but the transcripts decreased sharply with the sclerotial development. [Conclusion] Molecular characterization of *PuMAPK* will be useful

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30830117, 31201666)

*通讯作者: ✉: sxguo1986@163.com

收稿日期: 2015-02-17; 接受日期: 2015-04-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-08

for the further functional determination of the gene involving in the development of *P. umbellatus* sclerotium.

Keywords: *Polyporus umbellatus*, MAPK gene, 5'-RACE, Real-time quantitative PCR, Sclerotium development

丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[1]。研究证实, MAPKs 信号转导通路存在于大多数细胞内, 在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内, 并引起细胞生物学反应(如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)的过程中具有至关重要的作用。研究表明, MAPKs 信号转导通路在细胞内具有生物进化的高度保守性, 在低等原核细胞和高等哺乳类细胞内, 目前均已发现存在着多条并行的 MAPKs 信号通路, 不同的细胞外刺激可使用不同的 MAPKs 信号通路, 通过其相互调控而介导不同的细胞生物学反应^[2]。

真菌中共发现了 22 个 MAPK 基因, 根据这些 MAPK 基因的功能, 可将其分为以下 4 类: 与真菌生长发育相关的基因^[3]、与致病性有关的基因、与胁迫反应相关的基因^[4]以及功能未知的基因。参与真菌生长发育的 MAPK 基因主要参与调节菌丝发育、分生孢子或子囊孢子的形成、萌发等生理过程。到目前为止, 对于大型真菌子实体形成以及菌核发育的 MAPK 基因缺少相应的研究。

猪苓是我国重要的药用真菌, 因其菌核具有良好的利尿渗湿药用价值而受到广泛的关注。由于对野生猪苓资源毫无节制的采挖, 造成其资源的日益匮乏。猪苓菌丝形成菌核是解决猪苓资源匮乏的主要途径之一。目前对猪苓的研究已在中药化学^[5]、药理学^[6]、解剖生物学及生理生化^[7]等方面取得了诸多成就。但对猪苓菌丝形成菌核发育的分子机制缺少研究。本研究利用 RACE 技术从猪苓菌核中分离到一个 MAPK 基因, 并对其进行生物信息学及猪苓菌丝形成菌核过程中表达模式分析, 为进一步揭示其在猪苓菌核生长发育过程中的生物学功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

猪苓纯培养菌丝由中国医学科学院药用植物研究所真菌室提供, 该菌种由本实验室保藏, 编号为 ZL-001。

1.2 猪苓菌核培养

依据本实验室报道的方法^[8]将猪苓菌丝接种到人工培养基中。培养 20–30 d 后, 猪苓菌丝形成菌核, 30–40 d 为猪苓菌核的快速生长期。分别将初期菌核、发育菌核(SI、SD)和生长期未形成菌核的菌丝(HI、HD)立即放入液氮中预冷并–80 °C 保存以备提取 RNA。

1.3 总 RNA 提取及质量控制

利用 EASYspin Plus Kit (Aidlab, 中国)试剂盒并根据操作手册进行总 RNA 的提取。利用凝胶电泳检测 RNA 的完整性并通过 NanoDrop™ 2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)检测样品总 RNA 的质量和纯度。

1.4 5'-RACE-PCR 和基因克隆

为了获得完整的 MAPK 基因全长序列, 采用 5'-RACE-PCR 方法获取猪苓 MAPK 全长 cDNA。根据猪苓 EST 序列 Pu1317 使用 Primer5 软件设计 5'引物 GSP1 (5'-GCCAGAGGATTGCGTTCGGG AAG-3')。5'-RACE 实验使用 SMART™ RACE cDNA Amplification 试剂盒(Clontech, 美国)。

利用 BD PowerScript™ Reverse Transcriptase (Clontech, 美国)试剂盒获取 5'-RACE-Ready cDNA。分别以 GSP1 与试剂盒提供的 UPM 引物组合进行 5'-RACE。反应体系: 10×Advantage® 2 PCR buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 10 μmol/L GSP1 0.5 μL, 10×UPM (Universal Primer A Mix) 0.5 μL, 5'-RACE-Ready cDNA 1 μL, 50×Advantage® 2

Polymerase Mix (5 U/L) 0.5 μ L, 19.5 μ L ddH₂O, 总反应体积为 25 μ L。反应条件: 94 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 20 个循环; 72 °C 7 min。PCR 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后得到目的条带, 经切胶纯化后克隆到 pGEM-T 载体(Promega, 美国), 然后转化入 *E. coli* JM109 细胞(TaKaRa, 中国)中。阳性克隆由北京金唯智生物科技有限公司进行测序。

1.5 序列分析

使用多种在线生物信息学分析工具对得到的全长 cDNA 进行序列分析: BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), 以及 CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php/>)。应用 DNASTar 6.0 (Madison, 美国)进行多序列比对。用 MEGA (Version 5.0)软件对 MAPK 进行系统发育分析和进化树的构建。进化距离分析采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ)。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析

利用 MMLV Reverse Transcriptase (Promega, 美国)试剂盒并依据操作手册对样本 SI、SD、HI 和 HD 进行反转录。利用实时荧光定量 PCR 方法分析不同样本中猪苓 MAPK 基因的表达量变化, 以猪苓 18S rRNA 基因作为内参基因。根据已知的猪苓 MAPK 基因 EST 序列设计实时荧光定量 PCR 引物: qPCR-FP (5'-ATTTCGTGCGCTGCCGTTC-3') 和 qPCR-RP (5'-GATGCGCTTCTTCGGGTCA-3')。qPCR 反应按照 SYBR[®] Premix ExTaq[™] 试剂盒 (TaKaRa, 中国)的操作手册进行。PCR 反应体系 (25 μ L): 2 \times SYBR[®] Premix ExTaq[™] Master Mix 12.5 μ L, 引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, ROX Reference Dye 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 9 μ L。反应

条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。同时做熔解曲线。每个样本的 qPCR 反应做 3 次重复实验。C_t (Cycle threshold)值由 ABI PRISM 7500 软件生成, 采用 $\Delta\Delta C_T$ 法计算相对表达量^[9]。

2 结果与分析

2.1 猪苓 MAPK 基因的克隆

由于原 EST 序列具有完整的 3'端, 以 GSP1 为引物, 通过 5'-RACE-PCR 反应, 克隆、测序获得 827 bp 的序列, 与原来的 EST 序列拼接分析获得了一条 1 293 bp 的猪苓 MAPK 全长 cDNA。BLASTx 比对分析结果显示其与 *Postia placenta* MAPK C 端氨基酸残基具有 97% 一致性。因此将其定名为 PuMAPK, 提交 GenBank 获得注册号 JX035916。根据基因全长 cDNA 推定其氨基酸序列。猪苓 MAPK (PuMAPK) 基因的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 长 1 161 bp, 编码 386 个氨基酸, 推测分子量为 43.872 kD, 理论等电点为 6.68。

2.2 MAPK 基因编码蛋白的多序列比对分析

在 NCBI 对猪苓 MAPK 进行 BLASTp 分析(图 1), 结果所示, PuMAPK 有 MAPK 中 ERK1/2 类型的保守区。运用 DNASTar 6.0 中的 MegAlign 程序, 猪苓 PuMAPK 推定的氨基酸序列和其他 6 种真菌 MAPK 蛋白进行多序列比对分析(图 2)。结果表明, PuMAPK 与其他来源于担子菌的 MAPK 序列基本一致(图 2)。PuMAPK 与 *Coprinus cinereus*、*Laccaria bicolor*、*Volvarella volvacea*、*Postia placenta*、*Piriformospora indica* 的 MAPK 序列一致性分别高达 96%、95%、93%、97% 和 95%, 与核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的 SMK1 一致性为 73%。且包括 PuMAPK 在内的这类 MAPK 具有 TEY 结构位点。分析结果表明本研究克隆得到的 PuMAPK 其推定的氨基酸序列具有 MAPK 结构域, PuMAPK 为一新的编码 MAPK 基因。

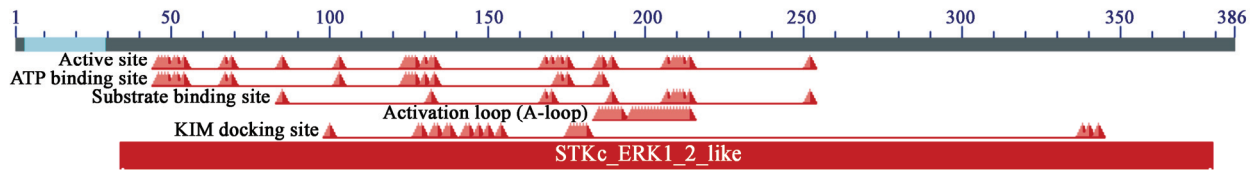


图1 BLASTp 分析猪苓 PuMAPK 基因全长 cDNA 的结构域
Figure 1 Analyses of PuMAPK cDNA domains of by BLASTp

1	MPEQAAPAAQAAAAK-----SKHSHAAASQAQPAPRKVRFNVGTQYQVLDVVVGEVAVGIVCSAHRPSGRKVAIKKIAP	Pu1317
1	MPEQAQPA---AAK-----SKHSHAAASQAQPAPRKVRFNVGSQYQVLDVVVGEVAVGIVCSAVHRPSGRKVAIKKIAP	<i>Postia placenta</i> -XP_002471708
1	MSSEQQPAAAAAAPKAAAAAQS-----SKHSHAAASQAQPAPRKVRFNVGTQYQVLDVVVGEVAVGIVCSAVHRPSGRKVAIKKIAP	<i>Piriformospora indica</i> -CCA74271
1	M---PPEPQAFTKSK-----SAPAAQPTPRKVRFNVTQYQVLDVVVGEVAVGIVCSAVHRPSGRKVAIKKIAP	<i>Laccaria bicolor</i> -XP_001881046
1	MS---QEGPAQAQAQAK-----KHHSHAAASQAQPAPRKVRFNVGTQYQVLDVVVGEVAVGIVCSAVHRPSGRKVAIKKIAP	<i>Coprinopsis cinerea</i> -XP_001832360
1	MASRAAPNPS-----SGSRKTSFNVGSQYQVLDVVVGEVAVGIVCSAHRPSGRKVAIKKIAP	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -AAQ54908
1	MPEQAAPAAQAAAAK-----NRQAAPAPRKVRFNVGTQYQVLDVVVGEVAVGIVCSAVHRPSGRKVAIKKIAP	<i>Volvariella volvacea</i> -ADA60180
74	FDHSMFCLRTLRELKLLKFLSEAGVSENIISILDIKPPSIECFKEVYLIQELMETDMHRVIRTQDLSDDHAQYFIYQTL	Pu1317
74	FDHSMFCLRTLRELKLLKFLSEAGVSENIISILDIKPPSIECFKEVYLIQELMETDMHRVIRTQDLSDDHAQYFIYQTL	<i>Postia placenta</i> -XP_002471708
80	FDHSMFCLRTLRELKLLKFLSEAGVSENIISILDIKPPSIECFKEVYLIQELMETDMHRVIRTQDLSDDHAQYFIYQTL	<i>Piriformospora indica</i> -CCA74271
66	FDHSMFCLRTLRELKLLKFLSEAGVSENIISILDIKPPSIECFKEVYLIQELMETDMHRVIRTQDLSDDHAQYFIYQTL	<i>Laccaria bicolor</i> -XP_001881046
72	FDHSMFCLRTLRELKLLKFLSEAGVSENIISILDIKPPSIECFKEVYLIQELMETDMHRVIRTQDLSDDHAQYFIYQTL	<i>Coprinopsis cinerea</i> -XP_001832360
57	FDHSMFCLRTLRELKLLKFLSEAGVSENIISILDIKPPSIECFKEVYLIQELMETDMHRVIRTQDLSDDHAQYFIYQTL	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -AAQ54908
70	FDHSMFCLRTLRELKLLKFLSEAGVSENIISILDIKPPSIECFKEVYLIQELMETDMHRVIRTQDLSDDHAQYFIYQTL	<i>Volvariella volvacea</i> -ADA60180
154	RALKALHSADVHRDLKPSNLLNANCDLKVCFGLARSVKTAEPSTGTGFMTEYVATRWYRAPEIMLTFKQYTKAIDV	Pu1317
154	RALKALHSADVHRDLKPSNLLNANCDLKVCFGLARSVKTAEPSTGTGFMTEYVATRWYRAPEIMLTFKQYTKAIDV	<i>Postia placenta</i> -XP_002471708
161	RALKALHSADVHRDLKPSNLLNANCDLKVCFGLARSVKTAEPSTGTGFMTEYVATRWYRAPEIMLTFKQYTKAIDV	<i>Piriformospora indica</i> -CCA74271
146	RALKALHSADVHRDLKPSNLLNANCDLKVCFGLARSVKTAEPSTGTGFMTEYVATRWYRAPEIMLTFKQYTKAIDV	<i>Laccaria bicolor</i> -XP_001881046
152	RALKALHSADVHRDLKPSNLLNANCDLKVCFGLARSVKTAEPSTGTGFMTEYVATRWYRAPEIMLTFKQYTKAIDV	<i>Coprinopsis cinerea</i> -XP_001832360
133	RALKALHSADVHRDLKPSNLLNANCDLKVCFGLARSVKTAEPSTGTGFMTEYVATRWYRAPEIMLTFKQYTKAIDV	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -AAQ54908
150	RALKALHSADVHRDLKPSNLLNANCDLKVCFGLARSVKTAEPSTGTGFMTEYVATRWYRAPEIMLTFKQYTKAIDV	<i>Volvariella volvacea</i> -ADA60180
234	WSVGCILAEMLSGKPLFPGRDYHHQLTILDLVLTPTLDEFYAITTRRSRDYIRALPFRKRKPFALFPNANPLAVDFLI	Pu1317
230	WSVGCILAEMLSGKPLFPGRDYHHQLTILDLVLTPTLDEFYAITTRRSRDYIRALPFRKRKPFALFPNANPLAVDFLI	<i>Postia placenta</i> -XP_002471708
241	WSVGCILAEMLSGKPLFPGRDYHHQLTILDLVLTPTLDEFYAITTRRSRDYIRALPFRKRKPFALFPNANPLAVDFLI	<i>Piriformospora indica</i> -CCA74271
226	WSVGCILAEMLSGKPLFPGRDYHHQLTILDLVLTPTLDEFYAITTRRSRDYIRALPFRKRKPFALFPNANPLAVDFLI	<i>Laccaria bicolor</i> -XP_001881046
232	WSVGCILAEMLSGKPLFPGRDYHHQLTILDLVLTPTLDEFYAITTRRSRDYIRALPFRKRKPFALFPNANPLAVDFLI	<i>Coprinopsis cinerea</i> -XP_001832360
210	WSVGCILAEMLSGKPLFPGRDYHHQLTILDLVLTPTLDEFYAITTRRSRDYIRALPFRKRKPFALFPNANPLAVDFLI	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -AAQ54908
230	WSVGCILAEMLSGKPLFPGRDYHHQLTILDLVLTPTLDEFYAITTRRSRDYIRALPFRKRKPFALFPNANPLAVDFLI	<i>Volvariella volvacea</i> -ADA60180
314	RTLTFDPKKRITVEEALAHPLYEAYHDPEDPEFVAPPPLDPEFFEFDLHKDDISREQLKELLYEEMSFREPEIMV	Pu1317
310	RTLTFDPKKRITVEEALAHPLYEAYHDPEDPEFVAPPPLDPEFFEFDLHKDDISREQLKELLYEEMSFREPEIMV	<i>Postia placenta</i> -XP_002471708
321	RTLTFDPKKRITVEEALAHPLYEAYHDPEDPEFVAPPPLDPEFFEFDLHKDDISREQLKELLYEEMSFREPEIMV	<i>Piriformospora indica</i> -CCA74271
306	RTLTFDPKKRITVEEALAHPLYEAYHDPEDPEFVAPPPLDPEFFEFDLHKDDISREQLKELLYEEMSFREPEIMV	<i>Laccaria bicolor</i> -XP_001881046
312	RTLTFDPKKRITVEEALAHPLYEAYHDPEDPEFVAPPPLDPEFFEFDLHKDDISREQLKELLYEEMSFREPEIMV	<i>Coprinopsis cinerea</i> -XP_001832360
290	RTLTFDPKKRITVEEALAHPLYEAYHDPEDPEFVAPPPLDPEFFEFDLHKDDISREQLKELLYEEMSFREPEIMV	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -AAQ54908
310	RTLTFDPKKRITVEEALAHPLYEAYHDPEDPEFVAPPPLDPEFFEFDLHKDDISREQLKELLYEEMSFREPEIMV	<i>Volvariella volvacea</i> -ADA60180

图2 猪苓 MAPK 蛋白序列(Pu1317)与担子菌 MAPK 蛋白的多序列比对
Figure 2 Multiple sequence alignment of PuMAPK and MAPK proteins from other fungus

2.3 MAPK 基因的系统进化树分析

通过 NCBI 检索选取高等真菌中的 MAPK 序列利用 MEGA 5.0 构建了包括 PuMAPK (Pu1317) 在内共 17 个 MAPK 的系统进化树(图 3)。序列包括 *Coprinus cinereus*、*Laccaria bicolor*、*Volvariella volvacea*、*Postia placenta*、*Piriformospora indica*、*Puccinia triticina*、*Sclerotinia sclerotiorum*、*Claviceps*

purpurea、*Neurospora crassa*、*Cryphonectria parasitica*、*Trichoderma reesei*、*Nectria haematococca*、*Fusarium oxysporum*、*Mus musculus*、*Saccharomyces cerevisiae* 和 *Cryptococcus neoformans*。*Schizosaccharomyces cerevisiae* 和 *Cryptococcus neoformans* 形成第一个分支,支持度为 100。担子菌群和子囊菌群聚类在两个姊妹群系

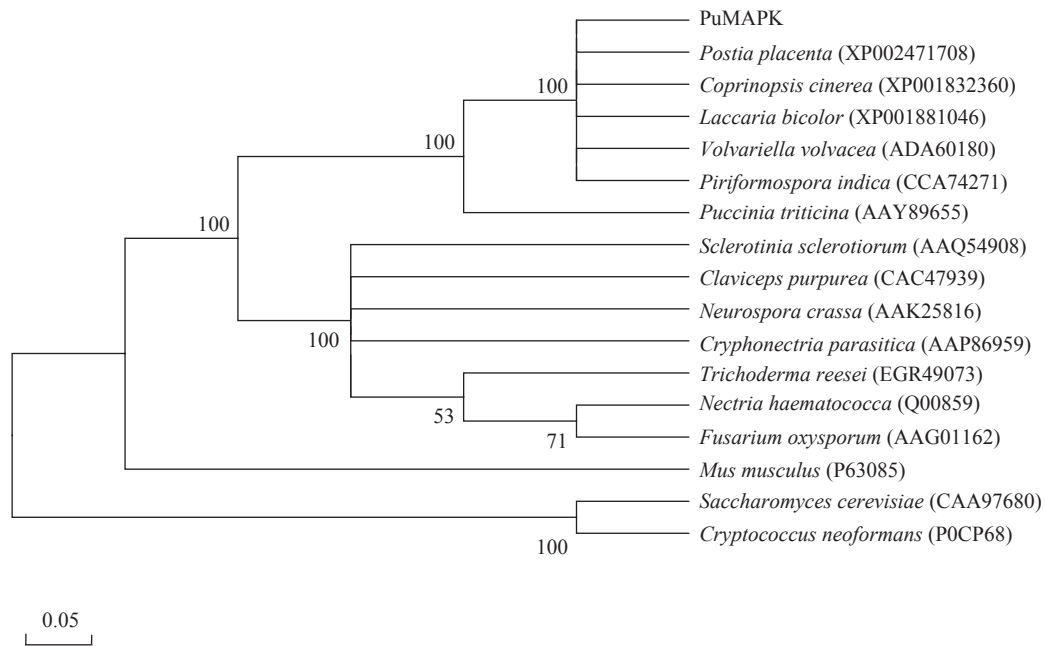


图3 猪苓 MAPK 基因序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of *PuMAPK* with various *MAPK* proteins

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

中,支持度为100。*PuMAPK*与担子菌类群聚集在一起,说明其与担子菌亲缘关系较近。

2.4 MAPK 基因表达特异性分析

分别取原基期(SI)和生长期(SD)的菌核和未形成菌核的菌丝体(HI、HD)总RNA,利用荧光定量PCR方法测定mRNA的表达量。以菌丝样本为对照组,检测了猪苓*PuMAPK*在不同生长时期菌核和菌丝组织间的转录水平差异(图4)。菌核形成初期*PuMAPK*在菌核中表达量高于菌丝7.863倍,至生长期时在菌核中的表达量仅为菌丝1.26倍。结果表明在猪苓菌核形成初期,菌核中的MAPK表达量显著高于菌丝组织,随着菌核的快速生长而减少。

3 结论

丝裂原活化蛋白激酶是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者。在真菌中,并行的MAPKs信号通路在细胞信号转导中并无相互作用,其每一条MAPKs通路都是相对独立的,通常不与其他通路发生交联^[4]。对真菌而言,不同的MAPKs

通路调节不同的生理过程;对于同样的刺激,几条并行的通路并不同时被激活;其中一条通路若出现突变,也不影响其他通路的信号传递。细胞外信号调节蛋白激酶(Extracellular signal regulated protein kinases, ERKs)是MAPK家族中的3个成员之一^[10]。ERKs有ERK1和ERK2两种同工酶。一般认为,ERK主要在生长因子相关刺激引起的细胞反应中

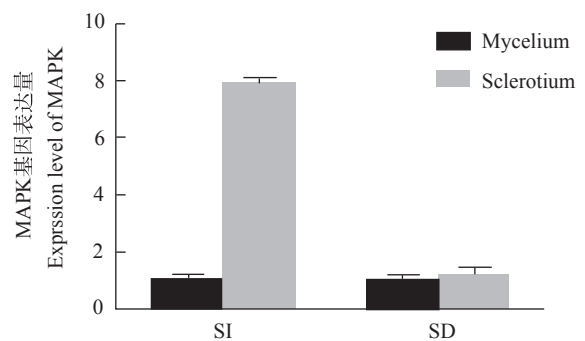


图4 菌核形成过程中猪苓 MAPK 的差异表达

Figure 4 Differential expression analysis of *MAPK* gene during sclerotial growth

起作用,主要参与细胞生长、分化和抗凋亡作用^[11]。 H_2O_2 预处理能持续激活 ERK1/2, ERK 活化能对抗氧化应激对细胞存活的损伤, ERK 通路是适应性细胞保护机制之一。Chen 等^[12]在核盘菌中鉴定得到一个与 ERK 同源的 *smk1*, 该基因转录水平和其编码的 MAPK 蛋白活性在菌核发育,尤其是菌核形成初期显著提高。当添加 MAPK 抑制剂时, *smk1* 表达受阻, 菌核发育受抑制。筛选获得 *smk1* 突变体, 该突变体不能形成菌核。研究表明, 核盘菌菌核形成发育受 ERK 类型 MAPK 的调控。本研究在猪苓中同样克隆得到与 *smk1* 一致性为 73% 的 ERK 类型 MAPK 基因 *PuMAPK*, 且该基因在菌核形成初期时在菌核组织中高水平转录, 表明该基因可能调控了猪苓菌核的形成。本研究将进一步通过 RNAi 研究 *PuMAPK* 基因在猪苓菌核生长发育中的生物学功能, 为猪苓菌丝形成菌核的研究提供分子机制的理论基础。

参 考 文 献

[1] Darling NJ, Cook SJ. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2014,

- 1843(10): 2150-2163
- [2] Pitzschke A. Modes of MAPK substrate recognition and control[J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(1): 49-55
- [3] Kitade Y, Sumita T, Izumitsu K, et al. MAPKK-encoding gene *Ste7* in *Bipolaris maydis* is required for development and morphogenesis[J]. *Mycoscience*, 2015, 56(2): 150-158
- [4] Alonso-Monge R, Román E, Arana DM, et al. Fungi sensing environmental stress[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009, 15(S1): 17-19
- [5] Zhao YY, Cheng XL, Zhang Y, et al. Simultaneous determination of eight major steroids from *Polyporus umbellatus* by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection[J]. *Biomedical Chromatography*, 2010, 24(2): 222-230
- [6] Zhao YY, Xie RM, Chao X, et al. Bioactivity-directed isolation, identification of diuretic compounds from *Polyporus umbellatus*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 126(1): 184-187
- [7] Xing YM, Chen J, Lü YL, et al. Determination of optimal carbon source and pH value for sclerotial formation of *Polyporus umbellatus* under artificial conditions[J]. *Mycological Progress*, 2011, 10(1): 121-125
- [8] Liu YY, Guo SX. Nutritional factors determining sclerotial formation of *Polyporus umbellatus*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 49(2): 283-288
- [9] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45
- [10] Gough NR. Focus issue: recruiting players for a game of ERK[J]. *Science Signaling*, 2011, 4(196): eg9
- [11] Li HE, Yao WJ, Fu YR, et al. De Novo assembly and discovery of genes that are involved in drought tolerance in Tibetan *Sophora moorcroftiana*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e111054
- [12] Chen CB, Harel A, Gorovoits R, et al. MAPK regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH and cAMP sensing[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(4): 404-413