中国科学 C 辑: 生命科学
2007 年 第 37 卷 第 2 期: 227~233
http://www.scichina.com

《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

红色毛癣菌孢子期与萌芽期基因表达比较分析

杨 莉[①②] 王玲玲[②] 彭俊平[②] 于 录[②] 刘 涛[②] 冷文川[②] 杨 剑[②]
陈立宏[②] 张文亮[②] 张 骞[②] 齐义鹏[①] 金 奇[①②③*]

(① 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072; ② 中国疾病预防控制中心病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100176;
③ 中国医学科学院病原生物学研究所, 北京 100730)

摘要 红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)是最常见和流行范围最广的一种浅部感染真菌, 它的孢子萌发是和致病密切相关且非常重要的发育过程. 为研究出芽时生理、生化以及细胞学方面的改变, 从红色毛癣菌 cDNA 文库中选取了 3364 条有明确功能注释的表达序列标签(ESTs)制备了 cDNA 芯片, 对孢子期及萌芽期进行了基因表达变化的研究. 数据分析表明, 孢子萌发过程中有 335 个基因表达上调, 主要是翻译、 修饰蛋白及结构蛋白. 细胞壁和细胞膜组分大量合成, 暗示它们是细胞形态发生的基础. 二组分信号转导系统的组成部分表达上调, 推测它可能在红色毛癣菌孢子萌发过程中起着重要作用. 各种代谢途径表达旺盛, 特别是参与糖酵解和氧化磷酸化的基因基本都上调, 说明在氧气和葡萄糖充足的环境下, 孢子主要通过有氧呼吸获得能量. 本研究对了解红色毛癣菌孢子萌发过程中基因表达的变化及其信号转导和代谢特点提供了重要线索, 对其他浅部真菌的研究也具有重要意义.

关键词 红色毛癣菌(***Trichophyton rubrum***) 孢子 萌发 **cDNA** 芯片 表达序列标签**(EST)** 基因表达

浅部真菌是真菌中流行范围最广的致病原, 可以引起体癣、股癣、手癣、足癣等疾病[1]. 而且 60% 以上的浅部真菌病由红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)所引起[2], 它不仅可引起上述人体各部位的癣病, 还可引起脓癣、脓肿和肉芽肿等深部感染, 是我国最常见的皮肤癣菌[1]. 随着生活水平的提高, 人们对生活质量的要求也越来越严格, 浅部真菌的研究日益受到关注. 目前酵母菌(*Saccharomyces cerevisia*)作为单细胞真菌的代表已经在真核细胞的遗传、 生化过程等方面得到了广泛的研究, 丝状真菌的 2 种模式生物粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)和构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的全基因组测序也相继完成[3,4], 与之相比浅部真菌的研究比较落后. 在这种情况下, 选择高致病性的红色毛癣菌作为浅部真菌的代表, 开展大规模结构与功能基因组研究, 能够从分子水平上了解浅部真菌的生理生化过程, 为其诊断和治疗提供线索和依据, 促进目前浅部真菌的研究.

真菌基因组庞大, 并含有大量的非编码序列, 为后续的基因预测和功能注释带来了困难. 而表达序列标签(expressed sequence tag, EST)能从基因水平真实地反映基因的表达, 更准确地提供基因结构与功能的信息, 因此近年来EST技术也开始用于研究真菌的基因功能[5]. 基因芯片作为一种高通量的筛选方法, 能够同时对大量基因的表达情况进行研究[6]. 红色毛癣菌的孢子是重要的感染原, 其在皮肤表面的黏附、定殖和侵袭是造成感染的重要原因, 因此与致病密

收稿日期: 2006-08-28; 接受日期: 2006-09-22
国家高技术研究发展计划(批准号: 2001AA223021)和国家重大科技攻关计划(批准号: 2002BA711A14)资助项目
* 联系人, E-mail: zdsys@vip.sina.com

切相关 [2]. 用cDNA芯片这一前沿生物技术研究红色毛癣菌孢子萌发过程中各功能基因的表达情况, 不仅有助于了解其致病相关基因的表达变化, 更有助于从整体分子水平认识红色毛癣菌的生长代谢机制, 为防治红色毛癣菌引起的癣病及抗真菌药物的开发提供了很好的策略.

从实验室构建的红色毛癣菌生长过程中 8 个不同时相的 cDNA 文库中, 选取有明确功能注释的 3364 条表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)制备了红色毛癣菌 cDNA 芯片, 对孢子期及萌芽期进行了基因表达变化的研究. 为了解红色毛癣菌孢子萌发这一重要发育过程中各功能基因的表达情况及其信号转导和代谢特点提供了重要线索, 对其他浅部真菌的研究也具有极为重要的意义.

1 材料和方法

1.1 cDNA 芯片的制作

为获得尽可能覆盖整个红色毛癣菌生长过程的 cDNAs, 收集红色毛癣菌生长 7, 10, 14, (7, 10, 15, 20, 28), (7, 10, 16, 22, 26, 28), (16, 20, 22), (26, 28), (34, 36)天的菌丝得到 8 个不同时相的样品, 用来构建了红色毛癣菌cDNA文库. 经过大规模测序和生物信息学分析, 获得7426条独特的ESTs . 通过与现有数据库进行比对并按照蛋白质直系同源簇数据库(clusters of orthologous groups of proteins, COG)对这些ESTs进行功能分类, 且用京都基因和基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)对其进行代谢途径的分析 [7], 最终选取有明确功能注释的 3364 条ESTs制备了红色毛癣菌cDNA芯片.

1.2 菌株及培养条件

菌株为北京大学真菌和真菌病研究中心保藏的红色毛癣菌临床分离株 BMU01672. 菌株培养所用的马铃薯葡萄糖琼脂、 蛋白胨和 *D*-葡萄糖为 Difco 公司产品. 挑取少许菌落接种于 PDA(39 g/L 马铃薯葡萄糖琼脂)斜面, 27.5℃培养 1 周. 用沙保氏液体培养基(40 g/L *D*-葡萄糖, 10 g/L 蛋白胨)从斜面冲取孢子, 静置分层后吸取上层孢子相, 离心收集孢子. 将孢子接种于沙保氏液体培养基(约 1×10^6 个/100 mL), 27.5℃摇床培养 4 h(萌芽期)和 10 天(菌丝生长旺盛期), 离心收集菌体.

1.3 总 RNA 提取与 mRNA 富集、反转录

本实验中用菌株培养 10 天生长旺盛期的 cDNA 为参照, 对孢子期和萌芽期基因表达情况进行研究. 总 RNA 提取使用 RNeasy® Plant Mini Kit(QIAGEN), 得到的总 RNA 用 NanoDrop 微定量仪定量. 孢子和萌芽期的总 RNA 量为 50 μg/杂交反应, 菌丝生长旺盛期总 RNA 量为 20 μg/杂交反应. mRNA 分离、 纯化使用 Oligotex mRNA Mini Kit(QIAGEN). 反转录合成使用 SUPERSCRIPT™ Plasmid System with GATEWAY™ Technology for cDNA Synthesis and Cloning Kit(Invitrogen). 纯化 cDNA 使用 Qia quick PCR purification Kit(QIAGEN).

1.4 标记、杂交与洗涤

标记反应采用 Bioprime DNA labeling System(Gibco)进行, 其中菌丝生长旺盛期的cDNA使用 Cy5-dCTP(Amersham) 标记. 孢子期和萌芽期的 cDNA 均采用 Cy3-dCTP(Amersham) 标记. 用 Qiagen 的Qia quick PCR purification Kit纯化上述标记产物后, 将Cy3 和Cy5 的标记产物混合, 65℃杂交过夜. 所有杂交重复 1 次, 芯片杂交洗涤见文献 [8].

1.5 芯片杂交结果的检测与分析

芯片杂交结果检测用 GenePix Personal 4100A 扫描仪, 图像定量分析采用 GenePix Pro 5.0 软件. 阳性信号的判断标准为%背景值(635 或 532)+2(标准偏差)≥50, 前景值(635 或 532)的中位数–背景值(635 或 532)＞阴性对照前景值(635 或 532)Median-B(635 或 532)均值, Flag=0. 上述条件都满足后, 用萌芽期该点的中位数比值的均值除以孢子该点的中位数比值的均值, 比值≥2 或者≤0.5 的基因才认为是在萌发过程中有表达差异的基因, 是主要的分析对象.

1.6 实时定量 RT-PCR 检测基因表达

将芯片实验中表达变化的 4 个基因用实时定量 RT-PCR 在 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)上进行检验. 用 5 ng 孢子期或萌芽期的 cDNA 作为模板, 来自两时相的 18S rRNA 分别作为内参照, 每个 PCR 反应重复 3 次, 反应混合液使用 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). 被检测基因和 18S rRNA 的引物设计使用 Primer Express 软件(Applied Biosystems) , 见表 1. 反应条件: 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个

循环. 系统软件监测每个循环中 SYBR Green I 荧光染料的变化并产生阈值循环数 *CT* 值, 样品的平均 *CT* 值分别减去该时相 18S rRNA 的平均 *CT* 值得到Δ*CT* 值, 用萌芽时相样品的Δ*CT* 值减去孢子时相样品的Δ*CT* 值得到ΔΔ*CT* 值, 基因的表达水平为 $2^{-\Delta\Delta CT}$.

表 1　实时定量 RT-PCR 检测的基因及其引物 [a)]

目的基因	引物序列	扩增长度/bp
18S	F, 5′-CGCTGGCTTCTTAGAGGGACTAT-3′ R, 5′-TGCCTCAAACTTCCATCGACTT-3′	51
ACT1	F, 5′-GCAGTGGTGTCGTTGTGGAT-3′ R, 5′-GACTGTGGACTCATAGACCGGAAT-3′	67
EDE1	F, 5′-GGCGGCTCAAGACAGTTCAC-3′ R, 5′-GGCCTCTTCCTCCATGAGTTG-3′	66
pleD	F, 5′-AGGTCGGTGGAGCGGTCG-3′ R, 5′-TTCAAGTCCTACAACGACACCTACG-3′	101
CTS2	F, 5′-GAGAGTCTCTCTGCAAGCCTTCA-3′ R, 5′-CTGGGAGTATCCCAAGGATGAG-3′	72

a) F 指正向引物, R 指反向引物

2　结果

2.1　cDNA 芯片的制备

将本实验室构建的红色毛癣菌生长过程中 8 个不同时相的 cDNA 库, 经过大规模测序和生物信息学分析, 获得 7426 条特异的 ESTs. 通过与现有数据库进行比对并按照 COG 库对这些 ESTs 进行功能分类, 发现约有 45.3% (3364 条) 红色毛癣菌 ESTs 所推导的蛋白质与其他生物中已知功能的基因产物具有不同程度的同源性, 7.2% (535 条) 的 ESTs 序列只有简单功能提示, 47.5%的 ESTs (3527 条)与所有已发现的蛋白质的基因没有同源性, 为全新的未知功能基因. 选取有明确功能注释的 3364 条 ESTs 制备了红色毛癣菌 cDNA 芯片, 其中参与翻译及生物发生(J)的基因占 10.6%, 翻译后修饰(O)的基因占 10%, 信号转导(T)的基因占 9.2%, 代谢相关基因占 50.4%. 3364 条已知功能 ESTs 在 COG 库中的功能分类见表 2.

2.2　各功能类基因的表达变化

芯片上 3364 条 ESTs 所代表的基因中, 在孢子期表达的有 2861 个, 萌芽期表达的有 2635 个. 两时相共同表达的基因有 2465 个, 其中萌芽期有 335 个基因表达上调, 136 个基因下调. 数据分析显示, 上调倍数最多的基因是 *ERG5* (7 倍), 它编码细胞色素 P450 酶, 参与麦角固醇的生物合成. *SEC11* 基因下调 8 倍,

表 2　芯片上 3364 条已知功能 ESTs 在 COG 库中的功能分类

	功能分类	数目	上调基因数目	下调基因数目
	信息存储和加工			
J	翻译, 核糖体结构及生物发生	355	102	9
A	RNA 加工和修饰	120	4	8
K	转录	344	15	17
L	DNA 复制、重组与修复	187	13	11
	细胞加工			
B	染色质结构和动力学	42	1	2
D	细胞分裂与染色体分离	86	6	5
Y	核结构	21	0	1
V	防御机制	70	3	1
T	信号转导	311	14	25
M	细胞包膜合成, 外膜	139	10	7
N	细胞运动与分泌	48	2	2
Z	细胞骨架	82	16	2
W	细胞外结构	20	1	0
U	细胞内运输,分泌和液泡转运	231	7	5
O	翻译后修饰、蛋白质折叠、伴侣	337	49	10
	代谢			
C	能量产生与转换	317	25	5
G	糖类转运与代谢	307	28	28
E	氨基酸转运与代谢	501	31	25
F	核苷酸转运与代谢	95	10	3
H	辅酶代谢	143	17	5
I	脂代谢	264	16	12
P	无机离子转运与代谢	304	13	21
Q	次级代谢产物的生物合成、转运及分解代谢	213	21	8
	总计	3364	335	136

编码信号肽酶复合体的催化亚基, 当蛋白质跨膜进入内质网后, 它将位于蛋白质末端的信号肽切除. 萌芽期表达变化的基因在相应功能类中所占比例见图 1.

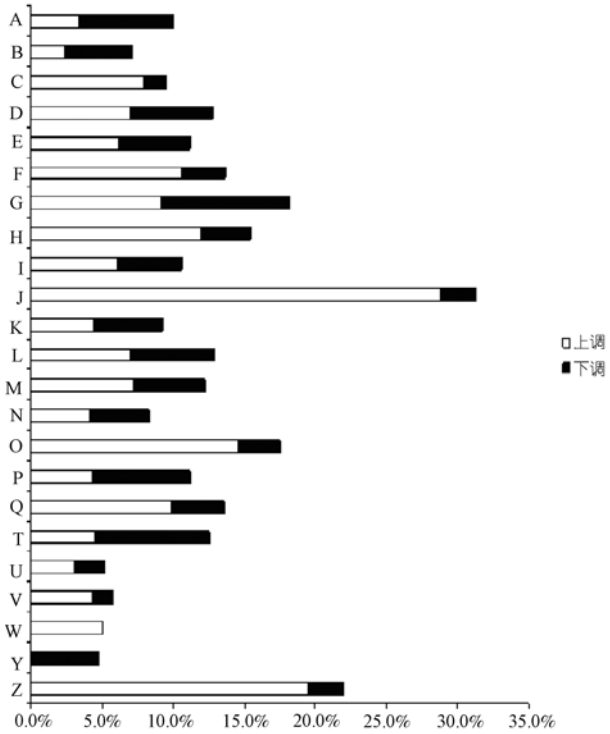

图 1 萌芽期表达变化的基因在相应功能类中所占比例

各字母所代表功能类见表 2

从图 1 可以看出, 蛋白质翻译及生物发生(J 类), 翻译后修饰 (O 类) 2 大功能类的基因很多在萌芽期发生表达变化, 且基本上都上调, 其产物主要是核糖体蛋白、tRNA 合成酶、蛋白水解酶和氧化还原酶、移位酶等, 这些都是合成功能有效的蛋白质所必需的工具和载体. 编码细胞骨架蛋白(Z 类)的基因也多数呈上调趋势, 其中包括基因 *ACT1* 和 *EDE1*, 它们编码的肌动蛋白及其相关的肌球蛋白是细胞骨架的主要结构组成部分.

真菌细胞壁的主要成分为己糖或氨基己糖构成的多糖链, 如几丁质和葡聚糖等, 细胞壁组分的代谢与其生长密切相关. 在红色毛癣菌孢子萌发的过程中, 细胞壁各组分的含量是动态变化的, 几丁质酶表达下调, 相应的几丁质合成酶表达上调, 而与葡聚糖合成和分解有关的酶类都下调.

红色毛癣菌 ESTs 中除了具有许多与高等哺乳动物相似的信号转导途径, 如丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)转导途径外, 还存在着多种高等哺乳动物没有的转导途径, 如二组分信号转导系统 (two-component signal transduction system, TCST), 可以看出 TCST 在红色毛癣菌的生理过程中有着重要的地位. 同时数据分析得知红色毛癣菌孢子萌发过程中参与二组分信号转导系统的组氨酸激酶基因 *SLN1* 及其反应调节器基因 *pleD* 都上调.

参与能量产生与转换 (C 类)的基因多数都表达上调, 主要产物是各种脱氢酶和氧化还原蛋白, 这些蛋白质通过参与各种代谢途径来产生和转换细胞生

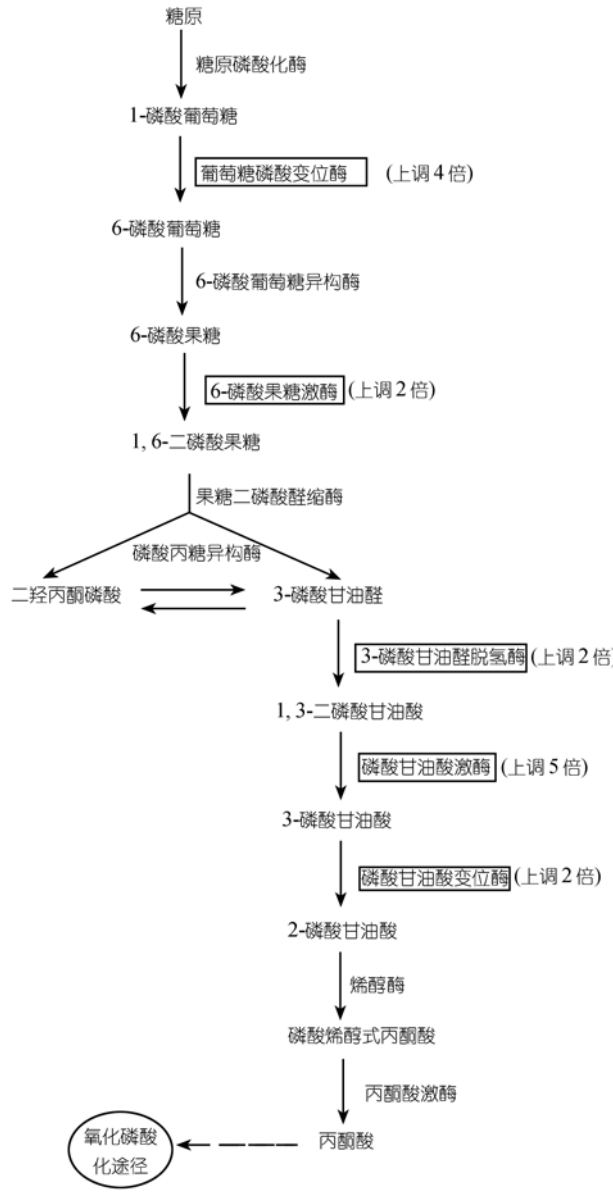

图 2 红色毛癣菌的糖酵解途径

框内为表达上调基因的编码产物

长所需的基本物质和能量. 红色毛癣菌具有各种细胞生理活动的基本代谢, 如糖类、脂类、蛋白质、核苷酸和辅酶代谢等, 这类基因在萌芽过程中发生变化的比较多, 其中糖代谢最为旺盛. 糖酵解是真菌一个重要的产能途径, 参与这一途径的葡萄糖磷酸变位酶, 6-磷酸果糖激酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸激酶, 磷酸甘油酸变位酶都表达上调(图 2). 氧气充足的情况下, 细胞进行氧化磷酸化作用. 参与氧化磷酸化代谢途径的 NADH 辅酶 Q 氧化还原酶、琥珀酸脱氢酶、 泛醇-细胞色素 c 还原酶、 细胞色素 c 氧化酶、 ATP 合成酶、细胞膜 ATP 酶在萌芽过程中也都表达上调.

2.3　实时定量 RT-PCR

用实时定量 RT-PCR 来验证芯片实验中 4 个基因(基因功能见讨论)表达水平的变化, 发现实验结果基本一致, 进一步证实了芯片数据的可信性(图 3).

3　讨论

目前丝状真菌的研究主要集中在 2 种模式生物粗糙脉孢菌和构巢曲霉, 随着真菌学研究的逐步深入, 其他丝状致病菌的研究也倍受关注, 如烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)等. 红色毛癣菌是致病性最广的浅部感染真菌的代表, 在生理代谢特点和致病机制上都与上述丝状真菌有较大差异, 将它作为模式生物研究对于促进浅部真菌学的发展具有重要意义. 孢子萌发产生菌丝的过程是其生长发育的重要阶段, 且红色毛癣菌感染主要是关节分生孢子与皮肤角质层接触后发生黏附, 孢子出芽进而形成菌丝引起的 [2]. 因此孢子萌发过程的研究不仅对其遗传和致病机制的揭示具有重要意义, 且会为红色毛癣菌的抗真菌药物发展提供很好的策略.

红色毛癣菌孢子萌芽是形态发生的重要转折点, 细胞生长需要大量结构蛋白的合成. 结果显示, 参与蛋白质合成和修饰的基因表达变化最多, 且基本都上调. 说明萌芽时细胞内翻译水平极其活跃, 大量合成了参与各种生命活动和代谢的功能蛋白, 特别是红色毛癣菌染色体复制、 转录与翻译等相关的结构蛋白.

细胞骨架蛋白是细胞进行一切生命活动的基础和平台, 它的表达也以上调为主, 其中编码肌动蛋白及其相关的肌球蛋白的基因*ACT1* 和*EDE1*(表达变化见图 3)明显上调. 肌动蛋白和肌球蛋白是细胞骨架的主要结构组成部分, 负责细胞内的骨架运输, 为长距离的载体运输提供结构基础[3]. 在孢子萌芽形成菌丝的过程中, 分泌小泡就是通过这些细胞骨架不断往菌丝生长的顶端运输细胞壁和膜合成所需的各种材料, 且细胞形态靠细胞骨架来支撑, 形态发生时细胞骨架蛋白大量合成是细胞生长发育的正常调控和策略.

细胞壁和细胞膜是真菌细胞的保护层, 也是抗真菌药物的主要作用部位. 粗糙脉孢菌的细胞壁由 10%的几丁质, 25%的β-1, 3-葡聚糖, 35%其他类的葡聚糖, 10%的蛋白质组成 [3]. 红色毛癣菌中也发现了大量几丁质酶、β葡聚糖合成酶等, 表明它的细胞壁中可能也含有丰富的几丁质和葡聚糖等. 在本实验中, 参与氨基糖代谢途径的几丁质酶基因*CTS2*(表达变化见图 3)表达下调, 几丁质分解通路被抑制. 而在几丁质合成通路中, 它上游的UDP-N-乙酰氨基葡萄糖焦磷酸化酶和几丁质合成酶又是表达上调的, 可以看出萌发过程中生成了大量的几丁质. 据报道, 几丁质在不同真菌细胞壁的含量变化甚大, 以丝状真菌的含量为最高, 它是酵母真菌出芽时的必要成分. 当双相

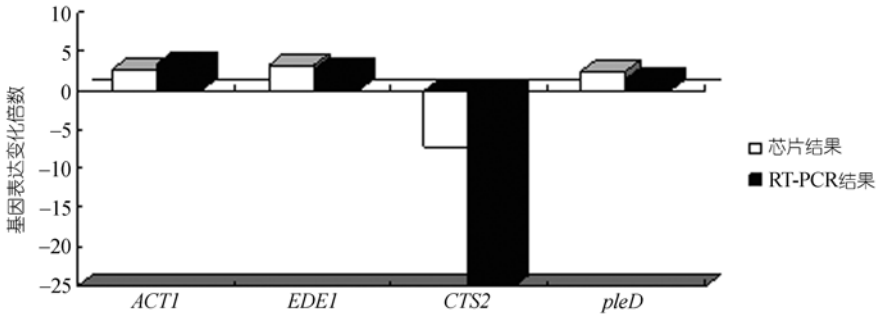

图 3　芯片实验和实时定量 RT-PCR 中基因表达水平的比较

真菌的酵母相转至菌丝相的过程时, 几丁质的合成增加达 3~4 倍之多 [1]. 本实验中亦是如此, 推测几丁质可能对于红色毛癣菌的出芽也相当重要. 同时它还参与细胞壁的生物合成和完整性的维护, 说明萌发过程中细胞壁的代谢也相当旺盛.

在上调基因中, 变化最大的是*ERG5*, 它编码细胞色素P450 酶, 参与麦角固醇的生物合成. 麦角固醇合成代谢是真菌独特的代谢类型, 麦角固醇是真菌细胞膜特有的脂质, 又是其重要的结构组成成分, 它在确保膜结构的完整性、膜结合酶的活性、膜流动性、细胞活力及物质运输等方面起着重要作用 [9], 真菌中麦角固醇含量的下降会直接影响真菌的生长繁殖和细胞的完整性. 红色毛癣菌的孢子萌发是生长发育的重要阶段, 麦角固醇作为其细胞膜的重要结构组成成分是不可缺少的, 所以在发芽时大量合成, 来满足细胞生长中伴随的细胞膜的合成需要.

孢子萌发是一个快速且非常重要的过程, 在丝状真菌中也是一个高度调控的过程 [10], 主要通过复杂的信号转导系统来控制. 不同真菌中的信号转导系统也是存在差异的, 在粗糙脉孢菌中存在 11 个组氨酸激酶, 但酿酒酵母中却只发现了 1 个, 裂殖酵母(*Saccharomyces pombe*)中仅存在 3 个 [3,11]. 在红色毛癣菌EST序列中也找到了多种信号转导组氨酸激酶基因, 看来二组分信号转导系统在丝状真菌中更为活跃.

原核生物和低等真核生物如酵母和其他真菌大都通过TCST来适应外界压力的刺激, 它由多种组氨酸激酶和反应调节器组成 [12]. TCST系统与真菌细胞的渗透调节、菌丝的生长发育、毒力、表型的转变及细胞壁的组装有关 [12~17]. 红色毛癣菌萌发过程中TCST组分表达上调, 包括调节高渗反应的组氨酸激酶基因 *SLN1* 及其反应调节器基因*pleD* (表达变化见图 3). 酿酒酵母中, 它们在高渗透压的刺激下, 会激活HOG MAPK信号转导途径, 诱导甘油合成来缓解压力 [18]. 推测TCST可能参与了红色毛癣菌从孢子到菌丝的形态发生过程中渗透压的调控, 并诱导细胞产生耐高渗的物质来达到自我保护的目的. 对这一系统的研究不仅有助于了解红色毛癣菌的生长发育过程及其与宿主之间的相互作用, 还为其他真菌的研究提供重要的线索.

一切生命活动都伴随着物质和能量的代谢, 孢子萌发更是不例外. 由表 2 可以看出, 红色毛癣菌萌芽过程中参与各种代谢的基因发生变化的比较多. 可能是因为孢子萌芽是一个耗能的过程, 而能量来源于糖、 脂类和蛋白质等有机物质在活细胞内的氧化分解, 这就要通过参与各种细胞生理活动的基本代谢来实现.

参与糖代谢的基因约有 18.24%发生变化, 表现的最为活跃. 尤其糖酵解途径中的 5 个关键酶都表达上调, 它是真菌的一个重要产能途径 [3]. 由于培养基中含有丰富的葡萄糖, 细胞就分解它来产生大量能量和代谢产物, 以满足生长发育的需求. 参与氧化磷酸化代谢途径的 6 个关键酶也都表达上调. 推测培养过程中, 由于孢子生长在氧气充足的环境下, 糖酵解生成的丙酮酸会进入氧化磷酸化途径, 同时糖酵解中产生的高能电子通过呼吸链逐步放出能量, 供生命活动需要. 说明孢子在氧气充足的条件下, 主要进行有氧呼吸, 而且有氧呼吸可以释放出更多的能量.

鉴于目前 60%以上的浅部真菌病由红色毛癣菌所引起, 将其作为浅部真菌的模式生物, 将促进浅部真菌学的研究, 它的孢子萌发与致病密切相关. 本文利用 cDNA 芯片快速、高通量的特点, 进行了这一过程的基因表达变化分析, 从整体分子水平了解了红色毛癣菌发芽过程中生理、 生化以及细胞学方面的改变, 为其他浅部真菌的研究提供了重要线索, 对于真菌病的防治具有重要意义.

参 考 文 献

1 闻玉梅, 陆德源, 何丽芳. 现代医学微生物学. 上海:上海医科大学出版社, 2000. 677—728

2 马 骊, 王玲玲, 冷文川, 等. 红色毛癣菌部分表达序列标签的分析. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2004, 34(2): 150—155

3 Borkovich K A, Alex L A, Yarden O, et al. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68 (1): 1—108[DOI]

4 Galagan J E, Calvo S E, Cuomo C, et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. Nature, 2005, 438: 1105—1115[DOI]

5 Chambergo F S, Bonaccorsi E D, Ferreira A J S, et al. Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. J Biol Chem, 2002, 277(16): 13983—13988[DOI]

6 Schena M, Shalon D, Davis R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 1995, 270 (5235): 467—470[DOI]

7 Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, et al. The KEGG resource for

deciphering the genome. Nucleic Acids Res, 2004, 32 (Database issue): 277—280[DOI]

8 Peng J P, Zhang X B, Yang J, et al. The use of comparative genomic hybridization to characterize genome dynamics and diversity among the serotypes of *Shigella*. BMC Genomics, 2006, 7: 218[DOI]

9 何秀萍, 张博润. 微生物麦角固醇的研究进展. 微生物学通报, 1998, 25(3): 166—169

10 Kasuga T, Townsend J P, Tian C G, et al. Long-oligomer microarray profiling in *Neurospora crassa* reveals the transcriptional program underlying biochemical and physiological events of conidial germination. Nucleic Acids Res, 2005, 33 (20): 6469—6485[DOI]

11 Galagan J E, Calvo S E, Borkovich K A, et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature, 2003, 422: 859—868[DOI]

12 Lengeler K B, Davidson R C, Souza C D, et al. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64 (4): 746—785[DOI]

13 Calera J A, Zhao X J, Calderone R. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. Infect Immun, 2000, 68 (2): 518—525[DOI]

14 Brinkman F S L, Macfarlane E L A, Warrener P, et al. Evolutionary relationships among virulence-associated histidine kinases. Infect Immun, 2001, 69 (8): 5207—5211[DOI]

15 Koretke K K, Lupas A N, Warren P V, et al. Evolution of two-component signal transduction. Mol Biol Evol, 2000, 17 (12): 1956—1970

16 Catlett N L, Yoder O C, Turgeon B G. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. Eukaryotic Cell, 2003, 2 (6): 1151—1161[DOI]

17 Alex L A, Borkovich K A, Simon M I. Hyphal development in *Neurospora crassa*: Involvement of a two-component histidine kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 3416—3421[DOI]

18 Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. Microbiol Mol Biol Rev, 2002, 66 (2): 300—372[DOI]