

灵芝 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与功能分析

周如月, 林嘉龙, 李烨凡, 秦佳雯, 李壮, 孟丽*

山东农业大学植物保护学院 山东省农业微生物重点实验室, 山东 泰安 271018

摘要: 灵芝是我国著名的药用真菌, 具有抗癌、抗肿瘤等功效。灵芝酸属于三萜类化合物, 是灵芝的主要活性成分, 并已成为评价灵芝品质的重要指标之一。 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BG)是次生代谢产物合成途径中的关键限速酶, 能够调节次生代谢产物的生物合成。本研究通过同源序列比对, 注释获得了灵芝 β -葡萄糖苷酶基因(*GIBG*), 并通过 RNAi 技术对灵芝 β -葡萄糖苷酶进行功能分析。序列分析结果显示 *GIBG* 基因的 DNA 全长为 2 759 bp, 包含 7 个外显子和 6 个内含子, 编码 793 个氨基酸, 其编码的蛋白序列中含有 β -糖苷水解酶的 2 个保守结构域。灵芝 β -葡萄糖苷酶基因的沉默转化子中灵芝酸含量比野生型菌株的灵芝酸含量平均降低了 38%, 并且灵芝酸生物合成途径中的关键酶基因(*hmgs*、*hmgr*、*fps*、*sqs* 和 *osc*)的表达量也显著下降, 实验结果表明灵芝 β -葡萄糖苷酶在灵芝酸生物合成过程中具有重要作用, 并为灵芝次生代谢途径及其调控机制提供了参考。

关键词: 灵芝; 灵芝酸; β -葡萄糖苷酶; 次生代谢

[引用本文] 周如月, 林嘉龙, 李烨凡, 秦佳雯, 李壮, 孟丽, 2022. 灵芝 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与功能分析. 菌物学报, 41(12): 1971-1979

Zhou RY, Lin JL, Li YF, Qin JW, Li Z, Meng L, 2022. Cloning and functional analysis of a β -glucosidase gene in *Ganoderma lingzhi*. Mycosystema, 41(12): 1971-1979

Cloning and functional analysis of a β -glucosidase gene in *Ganoderma lingzhi*

ZHOU Ruyue, LIN Jialong, LI Yefan, QIN Jiawen, LI Zhuang, MENG Li*

Key Laboratory of Agricultural Microbiology of Shandong Province, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

Abstract: *Ganoderma lingzhi* is a well-known medicinal fungus with anti-cancer and anti-tumor effects in China. Ganoderic acid (GA), a natural triterpenoid compound, is recognized as an

基金项目: 国家自然科学基金(32002107); 山东省食用菌产业技术体系(SDAIT-07-06)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32002107), and Mushroom Technology System of Shandong Province (SDAIT-07-06).

*Corresponding author. E-mail: mengli@sdaa.edu.cn

ORCID: MENG Li (0000-0001-7914-8961)

Received: 2022-03-19, accepted: 2022-04-08

important indicator for evaluating the quality of *G. lingzhi*. β -Glucosidase (BG) is a key rate-limiting enzyme involved in the regulation of secondary metabolites in *G. lingzhi*. In this study, the β -glucosidase gene (*GIBG*) of *G. lingzhi* was obtained by homologous sequence alignment and annotation, and the function of *GIBG* was analyzed by RNAi technology. Sequence analysis revealed that the full-length DNA of *GIBG* was 2 759 bp containing seven exons and six introns, encoding 793 amino acids. The protein sequence of *GIBG* contained two conserved domains of β -glycoside hydrolase. The ganoderic acid content in the *GIBG*-silencing transformants were reduced by an average of 38% compared to that in the wild-type strain, and the key enzyme genes (*hmgs*, *hmgr*, *fps*, *sqs*, *osc*) in the ganoderic acid biosynthesis pathway were also significantly decreased. These results indicated that *GIBG* played an important role in the secondary metabolism of *G. lingzhi*. This study provides a reference for further investigating the secondary metabolism and its regulatory mechanism in *G. lingzhi*.

Keywords: *Ganoderma lingzhi*; ganoderic acid; β -glucosidase; secondary metabolism

灵芝 *Ganoderma lingzhi* S.H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai 是我国著名的药用真菌(戴玉成等 2021), 具有抗肿瘤、降血压、降血糖和调节机体免疫力等功效(Ferreira *et al.* 2015; Kladar *et al.* 2016; Wu *et al.* 2019)。灵芝酸是其主要活性成分之一, 通过甲羟戊酸途径进行生物合成, 并受多种因素的影响, 如不同发育时期、化学和生物信号、物理因素和营养因素等(Ren *et al.* 2019)。其中不同发育阶段对灵芝酸含量的主要影响有子实体阶段的灵芝酸含量显著高于菌丝体阶段的灵芝酸含量; 化学和生物信号主要包括茉莉酸甲酯、水杨酸、乙烯、阿司匹林、 Na^+ 和 Cu^{2+} 等(Ren *et al.* 2010; Tang & Zhu 2010; Zhang *et al.* 2016; Cao *et al.* 2017); 物理因素主要包括热激、固体/液体培养方式和 pH 等(Calvo *et al.* 2002; You *et al.* 2012; Wu *et al.* 2016); 营养因素主要包括碳源、氮源和碳氮比等(Liu *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Hu *et al.* 2017)。此外, Ca^{2+} 、ROS 及磷脂等信号通路也参与调控灵芝酸的生物合成(Kim *et al.* 2018)。

β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)属于纤维素酶类, 是纤维素分解酶系中的重要组成成分, 它可将纤维二糖转化为葡萄糖(Singhania *et al.* 2017), 通过催化末端非还原性 β -D-葡萄糖残基的水解并释放 β -D-葡萄糖。 β -葡萄糖苷酶在许多领域具有

重要的应用价值, 例如: 纤维素降解、食品风味的改善等, 并且它存在于自然界中许多植物、昆虫、酵母、曲霉、木霉及细菌体内, 可参与生物体的糖代谢, 对维持生物体正常生理功能起着重要作用(Decker *et al.* 2001; Barbagallo *et al.* 2004)。此外, β -葡萄糖苷酶能将果、蔬、茶中的风味前体物质水解为具有浓郁天然风味的香气物质, 还能协助纤维素酶降解纤维素。因此对 β -葡萄糖苷酶的研究具有重要的理论和实用价值。

本研究通过同源序列比对和生物信息学分析, 注释得到灵芝的 β -葡萄糖苷酶基因, 为了进一步研究 β -葡萄糖苷酶在灵芝次生代谢生物合成中的作用, 本文构建了 β -葡萄糖苷酶基因的 RNAi 载体, 分析其在灵芝活性物质合成中的调控作用, 为灵芝次生代谢产物的生物合成及在生产中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

灵芝菌株(ACCC53264)由南京农业大学赵明文教授馈赠, 原始菌株保藏于中国农业微生物菌种保藏管理中心。灵芝菌株接种于完全培养基(CYM, 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 酵母提取物 2 g/L, 七水硫酸镁 0.5 g/L, 磷酸二氢钾 0.46 g/L)中, 26 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养 7 d, 收集菌丝体,

一部分菌丝体置于-80 ℃低温保存，用于 DNA 及 RNA 的提取，剩余菌丝体置于 60 ℃烘干箱内烘干至恒重，用于灵芝酸含量的测定。

1.2 灵芝 β-葡萄糖苷酶基因的生物信息学分析

通过同源比对注释获得灵芝的 β-葡萄糖苷酶基因，通过 DNAMAN 对其 DNA 和 cDNA 序列进行分析，确定基因的基本结构。利用 InterProscan 网站对灵芝 β-葡萄糖苷酶的氨基酸序列进行保守结构域预测，并在 NCBI (National Centre of Biotechnology Information)上对其进行比对分析，下载相关 β-葡萄糖苷酶的氨基酸序列，使用 MEGA5.0 通过邻接法(neighbor-joining algorithm, NJ)构建真菌 β-葡萄糖苷酶蛋白的系统发育树，使用 MEME 网站对所有序列进行 Motif 的预测。

1.3 灵芝 DNA 及 RNA 的提取

收集灵芝菌丝体，置于研磨钵中，液氮研磨至粉末状，分别利用 FastPure Plant DNA Isolation Mini Kit 试剂盒(诺唯赞)、RNAiso plus (TaKaRa)提取灵芝的 DNA 和 RNA,并通过 TransScript II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for PCR 试剂盒(全式金)将 RNA 反转录成 cDNA，利用引物 QC-*GIBG* (表 1)克隆 *GIBG* 基因的 DNA 和 cDNA 全长序列，用于后续实验，具体实验步骤参见试剂盒说明书。

1.4 灵芝 β-葡萄糖苷酶 RNAi 沉默载体的构建

1.4.1 灵芝 β-葡萄糖苷酶 *BG* 沉默片段的克隆
以 β-葡萄糖苷酶 *BG* cDNA 序列为模板，利用软件 primer premier 5.0 设计沉默片段引物 RNAi-*GIBG* (表 1)。通过 *Spe* I 和 *Kpn* I 两个酶切位点将沉默片段与质粒 pAN7-dual 进行连接，构建其 RNAi 载体 pAN7-dual-BGi。

1.4.2 RNAi 载体的转化及转化子的筛选
利用脂质体转化方法将 RNAi 载体转入到野生型菌株(wild type, WT)中(Meng *et al.* 2021)，经潮霉素抗性筛选，提取阳性转化子 RNA，反转录为 cDNA，通过荧光定量 PCR (qRT-PCR)对基因的沉默效率进行筛选,筛选 3 个沉默效率较高的转化子用于后续的功能分析。

1.5 灵芝酸含量的测定

收集在 CYM 培养基中振荡培养 7 d 的菌丝体，置于 60 ℃烘箱内烘干至恒重，用组织研磨器研磨成粉末，保存于 1.5 mL 离心管中，并根据 Meng *et al.* (2019)的方法对总灵芝酸含量进行测定。

1.6 基因表达量分析

利用荧光定量 PCR 技术检测干扰转化子的干扰效率及灵芝酸生物合成途径中关键酶基因的表达情况。荧光定量 PCR 的反应体系：模板 1 μL，上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL，

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene	上游引物 Forward primer (5'→3')	下游引物 Reverse primer (5'→3')
QC- <i>GIBG</i>	ATGGTGCAGAAAGGCTCAATGA	CTAGAGCGGGATGCTGCCCTTCAAA
RNAi- <i>GIBG</i>	TCTactagtAGGGAGGAAGGAATTGGG	GTTggtaccCGTATCTGCGATTGTGCC
18S <i>rRNA</i>	TATCGAGTTCTGACTGGGTTGT	ATCCGTTGCTGAAAGTTGTAT
<i>GIBG</i>	AGGGAGGAAGGAATTGGG	CGTATCTGCGATTGTGCC
<i>hmgS</i>	CCCATCAACGCTTCCACCA	GCTCCTCCTCCGAAATGC
<i>hmgR</i>	GTCATCCTCCTATGCCAAAC	GGGCGTAGTCGTAGTCCTTC
<i>fps</i>	CCTCATCACCGCTCCAGAA	AGGGCGACGGGAAGGTAGAA
<i>sqs</i>	CTGCTTATTCTACCTGGTGCTACG	GGCTTCACGCGAGTTTGT
<i>osc</i>	AGGGAGAACCCGAAGCATT	CGTCCACAGCGTCGCATAAC

2×PerfectStart Green qPCR SuperMix 10 μL, nuclease-free water 补足至 20 μL。反应程序: 94 ℃ 30 s, 94 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s (40 个循环)。以 18S 为内参基因, 引物序列见表 1, 计算方法采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。

2 结果与分析

2.1 灵芝 β-葡萄糖苷酶基因的生物信息学分析

本实验通过同源比对, 获得编码灵芝 β-葡萄糖苷酶的基因 *GIBG*, 通过基因克隆, 分别获得了 *GIBG* 的 DNA 和 cDNA 序列。通过基因序列分析表明, 基因 *GIBG* 的 DNA 序列全长为 2 759 bp, 包含 7 个外显子和 6 个内含子(图 1A)。此外, 灵芝 β-葡萄糖苷酶由 793 个氨基酸组成, 通过蛋白保守结构域预测, 其氨基酸序列包含糖苷水解酶的 2 个保守结构域(图 1B), 分别为 Glyco_hydro_3_N (IPR001764)和 Glyco_hydro_3_C (IPR002772)。

2.2 灵芝 β-葡萄糖苷酶的系统发育分析

为了深入分析真菌中 β-葡萄糖苷酶的亲缘关系, 将灵芝的 β-葡萄糖苷酶与其他真菌的 28 个 β-葡萄糖苷酶的氨基酸序列利用 NJ 法构建系统

发育树(图 2)。系统发育分析结果显示, 真菌中的 β-葡萄糖苷酶的氨基酸序列较为保守, 均含有 3 个典型的保守基序 Motif 1、Motif 2 和 Motif 3, 并且保守结构域在序列中分布基本相同。此外, 研究发现, 真菌的 β-葡萄糖苷酶主要分为两个分支, 其中担子菌聚为一支, 子囊菌聚为一支, 说明真菌在进化过程中, 担子菌和子囊菌的 β-葡萄糖苷酶在进化速度上有所差异。系统发育分析结果表明注释获得的序列为灵芝的 β-葡萄糖苷酶, 并且灵芝的 BG 蛋白在进化上是保守的。

2.3 灵芝 β-葡萄糖苷酶 RNAi 沉默载体的构建

以灵芝 cDNA 为模板, PCR 扩增获得灵芝 *GIBG* 基因的沉默片段(图 3A)。通过 *Spe* I 和 *Kpn* I 两个酶切位点, 将灵芝 RNAi 沉默片段与质粒 pAN7-dual 进行连接, 将构建好的载体命名为 pAN7-dual-BGi (图 3B)。灵芝 *GIBG* 基因的沉默片段由两个方向相反的启动子(*Glgpd* 和 35S promoter)双向启动转录, 从而表达正义和反义 *GIBG* 基因的沉默片段, 进行转录水平上的干扰。采用脂质体转化的方式将沉默载体转化到灵芝的原生质体中, 静置培养一段时间后再涂布至含有潮霉素抗性的平板中进行抗性筛选。提取

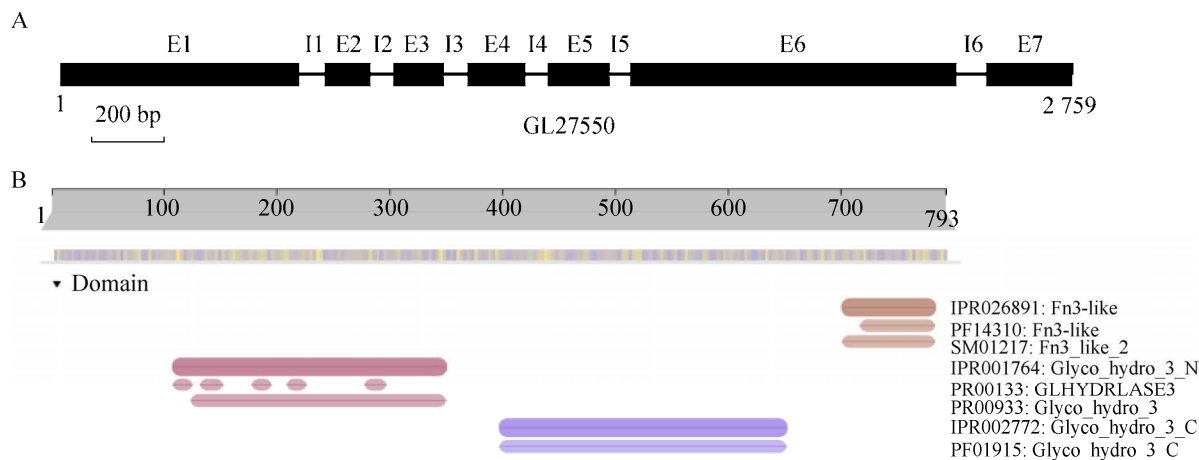


图 1 灵芝 β-葡萄糖苷酶的基因结构和保守结构域 A: 基因结构(E 为外显子, I 为内含子); B: 保守结构域

Fig. 1 The gene structure and conserved domain of β-glucosidase in *Ganoderma lingzhi*. A: The gene structure (E, exon; I, intron); B: Conserved domain.

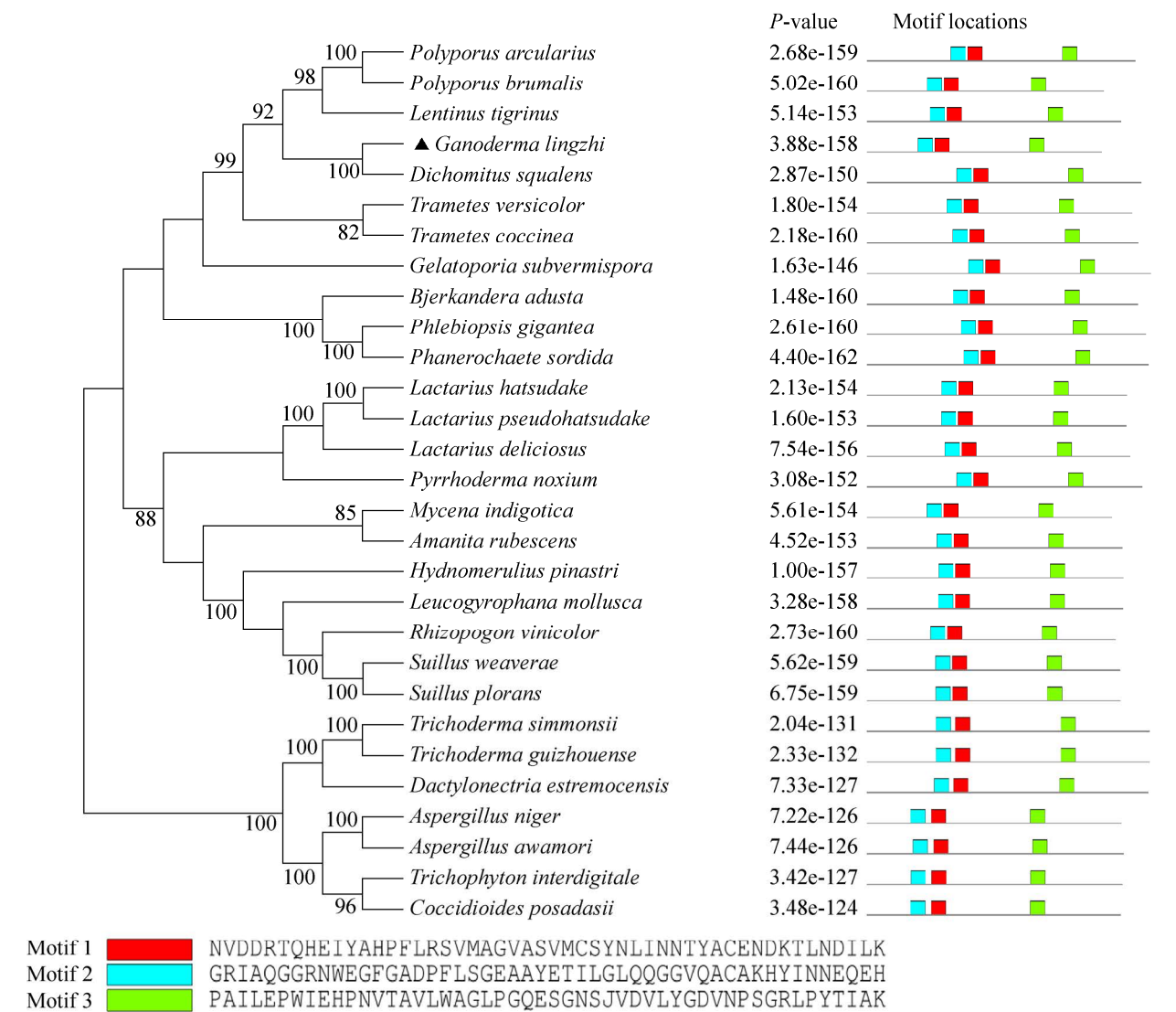


图 2 不同真菌 β -葡萄糖苷酶系统发育树分析和蛋白结构比对 使用 MEGA.5.0 对真菌 BG 蛋白进行序列比对并利用邻接法构建系统发育树(1 000 次重复)

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of β -glucosidase from different fungi and protein structure alignment. Sequence alignment and neighbor-joining tree construction of fungal BG proteins using MEGA.5.0 (1 000 repeats).

阳性转化子的 RNA，反转录成 cDNA，通过荧光定量 PCR 对阳性菌株的干扰效率进行筛选，筛选出 3 个沉默效率较高的菌株，用于下一步灵芝 β -葡萄糖苷酶的功能分析。

2.4 灵芝 β -葡萄糖苷酶对灵芝酸生物合成的影响

分别将野生型菌株(WT)、转入空质粒载体的对照菌株(CK)和 RNAi 沉默菌株(BGi-45、

BGi-87 和 BGi-88)接种于 CYM 固体培养基上，26 $^{\circ}$ C 恒温培养，研究发现灵芝 β -葡萄糖苷酶 *GIBG* 的沉默菌株与野生型和对照菌株在菌落形态和菌丝生长速度方面无明显差异(图 4A)。本实验利用荧光定量 PCR 技术进一步检测了 WT 与沉默菌株中 *GIBG* 基因在转录水平上的表达情况，研究发现沉默菌株 BGi-45、BGi-87 和 BGi-88 的沉默效率分别为 87%、94%和 92%，

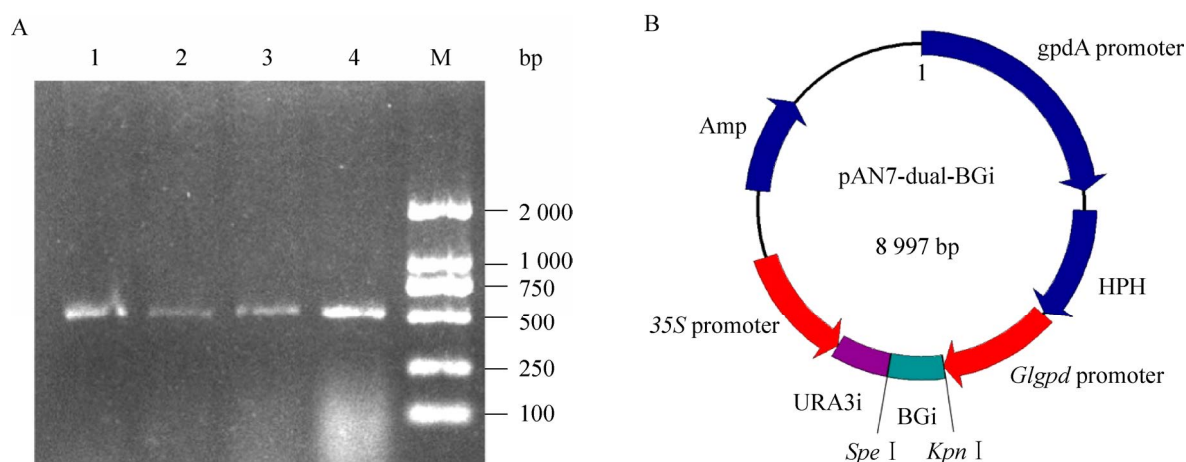


图3 灵芝葡萄糖苷酶 *GIBG* 沉默菌株的构建 A: RNAi 载体构建菌液 PCR 凝胶电泳结果. M: DL2000 marker, 1–4 号泳道均为待测质粒 PCR 扩增结果; B: *GIBG* 沉默载体的构建示意图

Fig. 3 Construction of *GIBG*-silencing strain. A: Gel electrophoresis of PCR products. M: DL2000 marker; 1–4: PCR amplification results of the RNAi plasmid; B: Schematic diagram of the construction of *GIBG*-silencing vector.

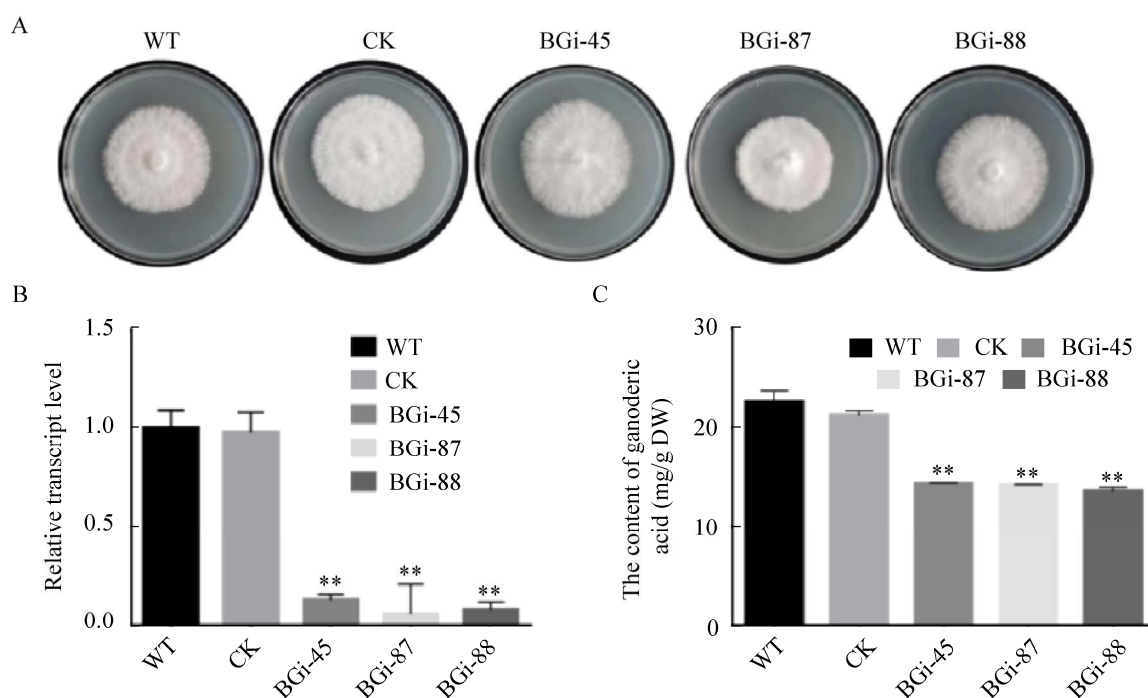


图4 灵芝 β -葡萄糖苷酶基因沉默菌株对菌丝生长和灵芝酸含量的影响 A: 不同菌株在 CYM 平板上生长 7 d 的菌落形态; B: *GIBG* 基因的相对表达量; C: 灵芝酸含量. WT, 野生型; CK, 转入 pAN7-dual 空质粒的对照菌株; BGi-45, 87 和 88 为 *GIBG* 的沉默菌株. 下同

Fig. 4 Effects of *GIBG*-silencing strains on mycelial growth and ganoderic acid content of *Ganoderma lingzhi*. A: The morphology of different strains cultured on CYM plates for 7 d; B: The relative transcript levels of *GIBG*; C: The content of ganoderic acid. WT, wild type; CK, the vector where pAN7-dual is used as an empty vector control; BGi-45, 87 and 88 are *GIBG*-silencing strains. The same below.

沉默效率较好(图 4B),可用于后续的功能分析实验。由于 β -葡萄糖苷酶在次生代谢产物生物合成中发挥重要作用,因此,本实验检测了 β -葡萄糖苷酶基因沉默菌株中的灵芝酸含量。研究结果显示, β -葡萄糖苷酶基因的沉默菌株 BGi-45、BGi-87 和 BGi-88 中的总灵芝酸含量分别为 14.27、14.15 和 13.56 mg/g,与野生菌株的 22.54 mg/g 分别下降了 36.70%、37.22%和 39.84% (图 4C)。实验结果显示,灵芝 β -葡萄糖苷酶参与了灵芝酸的生物合成。

2.5 灵芝 β -葡萄糖苷酶对灵芝酸生物合成关键酶的影响

为了进一步研究灵芝 β -葡萄糖苷酶对灵芝酸生物合成的影响,利用荧光定量 PCR 检测了灵芝酸生物合成中几个关键酶基因(*hmgs*、*hmgr*、*fps*、*sqs* 和 *osc*)的表达水平。研究结果显示,在灵芝 β -葡萄糖苷酶基因的沉默菌株 BGi-45、BGi-87 和 BGi-88 中,检测的 5 个关键酶基因表达量相较于野生型和对照菌株的基因表达量均显著下降(图 5)。实验结果显示,灵芝酸生物合成酶基因的表达量与灵芝酸的含量趋势一致,说明 β -葡萄糖苷酶基因的沉默可影响灵芝酸生物合成关键酶的表达情况,从而影响灵芝酸的生物合成,引起灵芝酸含量的下降。

3 讨论

β -葡萄糖苷酶(BG)是纤维素水解的限速酶,可将低聚糖和双糖纤维二糖水解成葡萄糖,从而为真菌的生长提供一个易于利用的碳源。BG 蛋白发挥的生物学功能也较为广泛,如 BG 在糖脂和外源糖苷代谢、防御、细胞壁木质化、细胞壁 β -葡聚糖周转、植物激素激活和芳香化合物释放以及微生物生物量转化中发挥重要作用(Singhania *et al.* 2017; 杨世玲等 2017)。因此,付永平等(2012)构建了木霉 β -葡萄糖苷酶 *bgl* I 基因的真核表达载体,并利用真

核表达系统在粟酒裂殖酵母中进行表达,获得了高活性的 β -葡萄糖苷酶,并研究了不同温度对其酶活性的影响,研究发现真核表达的 β -葡萄糖苷酶耐高温,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下仍可以保持较高的酶活性,因此在工业中具有较好的应用前景。

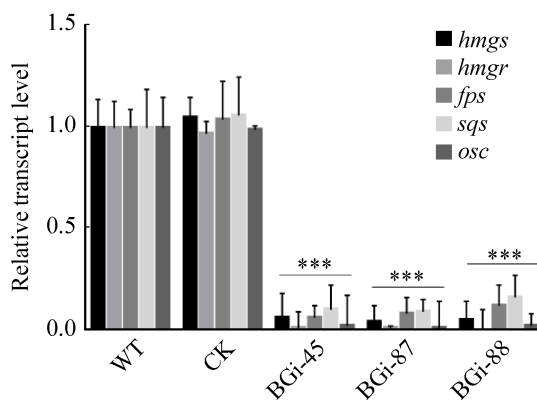


图 5 灵芝 β -葡萄糖苷酶基因沉默菌株对灵芝酸生物合成关键酶基因的影响 *hmgs*: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶基因; *hmgr*: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因; *fps*: 法尼基焦磷酸合酶基因; *sqs*: 鲨烯合酶基因; *osc*: 氧化鲨烯环化酶基因

Fig. 5 Effects of *GIBG*-silencing strains on the gene encoding key enzymes during ganoderic acid biosynthesis gene. *hmgs*: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene; *hmgr*: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase gene; *fps*: Farnesyl pyrophosphate synthase gene; *sqs*: Squalene synthase gene; *osc*: Oxidosqualene cyclase gene.

β -葡萄糖苷酶不仅是纤维素酶系的主要组分,而且与真菌的子实体形态建成也密切相关,隋飞飞和陈艳秋(2015)研究了桦褐孔菌的 β -葡萄糖苷酶基因 *IO-BGL*,发现 *IO-BGL* 在桦褐孔菌菌核发育过程中差异表达,呈先上升后下降的趋势,而在草菇中, *BGL* 基因则呈逐渐增加的趋势(Ding *et al.* 2007),但是关于 *BGL* 对子实体形态建成调控机理的研究较少,调控机制尚不明确。

此外, β -葡萄糖苷酶在调控植物次生代谢产物生物合成方面也发挥重要作用,当橄榄 β -葡

葡萄糖苷酶基因(*OeGLU*)沉默后会破坏橄榄环烯醚萜类化合物的生物合成能力(Koudounas *et al.* 2021)。为进一步探究 β -葡萄糖苷酶对真菌次生代谢产物生物合成的影响,本研究克隆到灵芝的 β -葡萄糖苷酶 *GIBG* 基因,发现灵芝 β -葡萄糖苷酶基因沉默后,灵芝酸的生物合成能力明显降低。结果显示 β -葡萄糖苷酶在真菌中也具有相似的功能,可调控次生代谢产物的生物合成,并通过 KEGG 分析发现 β -葡萄糖苷酶参与了淀粉和蔗糖代谢(starch and sucrose metabolism)、次生代谢产物的生物合成(biosynthesis of secondary metabolites)、氰基氨基酸代谢(cyanoamino acid metabolism)、植物次生代谢产物的生物合成(biosynthesis of various plant secondary metabolites)以及多种代谢通路(metabolic pathways)。在植物次生代谢产物生物合成通路中, β -葡萄糖苷酶基因同时涉及到苯丙氨酸生物合成、三羧酸循环以及三萜类骨架的生物合成,当 β -葡萄糖苷酶基因沉默后,直接影响苯丙氨酸的生物合成,从而影响三羧酸循环,而三羧酸循环中的乙酰辅酶 A 同时是三萜类骨架生物合成中的重要前体物质,当 β -葡萄糖苷酶基因沉默后,植物次生代谢也随之发生改变。基于此,本研究推测灵芝的次生代谢途径也受到了类似的影响。真菌是天然产物生物合成的重要来源,因此对次生代谢产物生物合成的研究显得尤为重要。本研究发现灵芝 β -葡萄糖苷酶基因对灵芝酸生物合成具有重要的调控作用,为灵芝的遗传改良、筛选灵芝酸高产菌株提供了理论依据。

[REFERENCES]

- Barbagallo RN, Spagna G, Palmeri R, Restuccia C, Giudici P, 2004. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(1): 58-66
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP, 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 447-459
- Cao PF, Wu CG, Dang ZH, Shi L, Jiang AL, Ren A, Zhao MW, 2017. Effects of exogenous salicylic acid on ganoderic acid biosynthesis and the expression of key genes in the ganoderic acid biosynthesis pathway in the Lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(1): 65-73
- Dai YC, Yang ZL, Cui BK, Wu G, Yuan HS, Zhou LW, He SH, Ge ZW, Wu F, Wei YL, Yun Y, Si J, 2021. Diversity and systematics of the important macrofungi in Chinese forests. *Mycosystema*, 40(4): 770-805 (in Chinese)
- Decker C, Visser J, Schreier P, 2001. Beta-glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(2): 157-163
- Ding SJ, Ge W, Buswell JA, 2007. Molecular cloning and transcriptional expression analysis of an intracellular β -glucosidase, a family 3 glycosyl hydrolase, from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiology Letters*, 267(2): 221-229
- Ferreira ICFR, Heleno SA, Reis FS, Stojkovic D, Queiroz MJRP, Vasconcelos MH, Sokovic M, 2015. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*, 114: 38-55
- Fu YP, Li B, Wang PW, Gao W, Xia HF, Zhang Z, 2012. Expression and functional analysis of a β -glucosidase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*. 40(12): 171-176 (in Chinese)
- Hu YR, Ahmed S, Li JW, Luo BB, Gao ZY, Zhang QY, Li XH, Hu XB, 2017. Improved ganoderic acids production in *Ganoderma lucidum* by wood decaying components. *Scientific Reports*, 7: 46623
- Kim HS, Kim JE, Son H, Frailey D, Cirino R, Lee YW, Duncan R, Czymmek KJ, Kang S, 2018. Roles of three *Fusarium graminearum* membrane Ca^{2+} channels in the formation of Ca^{2+} signatures, growth, development, pathogenicity and mycotoxin production. *Fungal Genetics and Biology*, 111: 30-46
- Kladar NV, Gavarić NS, Božin BN, 2016. *Ganoderma*: insights into anticancer effects. *European Journal of Cancer Prevention*, 25(5): 462-471
- Koudounas K, Thomopoulou M, Rigakou A, Angeli E, Melliou E, Magiatis P, Hatzopoulos P, 2021. Silencing of oleuropein β -glucosidase abolishes the biosynthetic capacity of secoiridoids in olives. *Frontiers in Plant*

- Science, 12: 671487
- Liu GQ, Wang XL, Han WJ, Lin QL, 2012. Improving the fermentation production of the individual key triterpene ganoderic acid me by the medicinal fungus *Ganoderma lucidum* in submerged culture. *Molecules*, 17(11): 12575-12586
- Meng L, Bai XR, Zhang SY, Zhang MF, Zhou S, Mukhtar I, Wang L, Li Z, Wang W, 2019. Enhanced ganoderic acids accumulation and transcriptional responses of biosynthetic genes in *Ganoderma lucidum* fruiting bodies by elicitation supplementation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11): 2830
- Meng L, Zhang SY, Chen BZ, Bai XR, Li YF, Yang J, Wang W, Li CT, Li Y, Li Z, 2021. The MADS-box transcription factor GIMADS1 regulates secondary metabolism in *Ganoderma lucidum*. *Mycologia*, 113(1): 12-19
- Ren A, Qin L, Shi L, Dong X, da Shuai Mu, Li YX, Zhao MW, 2010. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, 101(17): 6785-6790
- Ren A, Shi L, Zhu J, Yu HS, Jiang AL, Zheng HH, Zhao MW, 2019. Shedding light on the mechanisms underlying the environmental regulation of secondary metabolite ganoderic acid in *Ganoderma lucidum* using physiological and genetic methods. *Fungal Genetics and Biology*, 128: 43-48
- Singhania RR, Patel AK, Pandey A, Ganansounou E, 2017. Genetic modification: a tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. *Bioresource Technology*, 245: 1352-1361
- Sui FF, Chen YQ, 2015. Cloning and quantitative expression of a β -glucosidase gene from *Inonotus obliquus*. *Acta Edulis Fungi*, 22(3): 1-6 (in Chinese)
- Tang YJ, Zhu LW, 2010. Improvement of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharide biosynthesis by *Ganoderma lucidum* fermentation under the inducement of Cu^{2+} . *Biotechnology Progress*, 26(2): 417-423
- Wang JL, Gu TY, Zhong JJ, 2012. Enhanced recovery of antitumor ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia by novel chemical conversion strategy. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(3): 754-762
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98(1): 1-76
- Wu FL, Zhang G, Ren A, Dang ZH, Shi L, Jiang AL, Zhao MW, 2016. The pH-responsive transcription factor PacC regulates mycelial growth, fruiting body development, and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *Mycologia*, 108(6): 1104-1113
- Yang SL, Liu Y, Xue CR, Wang L, He L, Liu SW, 2017. Cloning and bioinformatic analysis of the β -glucosidase gene in *Oenococcus oeni*. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 17(7): 199-207 (in Chinese)
- You BJ, Lee HZ, Chung KR, Lee MH, Huang MJ, Ni TE, Chan CW, Kuo YH, 2012. Enhanced production of ganoderic acids and cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* using solid-medium culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(8): 1529-1534
- Zhang X, Ren A, Li MJ, Cao PF, Chen TX, Zhang G, Shi L, Jiang AL, Zhao MW, 2016. Heat stress modulates mycelium growth, heat shock protein expression, ganoderic acid biosynthesis, and hyphal branching of *Ganoderma lucidum* via cytosolic Ca^{2+} . *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14): 4112-4125

[附中文参考文献]

- 戴玉成, 杨祝良, 崔宝凯, 吴刚, 袁海生, 周丽伟, 何双辉, 葛再伟, 吴芳, 魏玉莲, 员瑗, 司静, 2021. 中国森林大型真菌重要类群多样性和系统学研究. *菌物学报*, 40(4): 770-805
- 付永平, 李博, 王丕武, 高玮, 夏海丰, 张卓, 2012. β -葡萄糖苷酶 *bgl I* 基因在粟酒裂殖酵母中的表达及功能分析. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 40(12): 171-176
- 隋飞飞, 陈艳秋, 2015. 桦褐孔菌 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与定量表达分析. *食用菌学报*, 22(3): 1-6
- 杨世玲, 刘叶, 薛楚然, 王玲, 何玲, 刘树文, 2017. 酒球菌 β -葡萄糖苷酶基因克隆及生物信息学分析. *中国食品学报*, 17(7): 199-207