

# 草菇 VvLaeA 调控球孢白僵菌的生长发育

陈金峰<sup>1,2\*</sup>

1 重庆第二师范学院生物与化学工程学院, 重庆 400067

2 重庆第二师范学院大健康产业学院, 重庆 400067

陈金峰. 草菇 VvLaeA 调控球孢白僵菌的生长发育[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 685-694.

CHEN Jinfeng. Effect of VvLaeA on the growth and development of *Beauveria bassiana*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 685-694.

**摘 要:** 食用真菌草菇 [*Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Sing.] VvLaeA 在调控真菌发育方面的功能并不清楚。本研究在对草菇 VvLaeA 进行生物信息学分析基础上, 通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的方法将超量表达启动子 *Vvgpd* 和草菇 *VvlaeA* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 进行融合, 并将融合片段克隆入 pK2(bar) 载体。采用农杆菌介导的转化方法将重组载体 pK2(bar)-OE*VvlaeA* 转入球孢白僵菌中进行表达, 测定转化子的菌株发育情况。结果表明, 草菇 VvLaeA 与其他真菌的蛋白同源性较低; 和野生型相比, 转化菌株的菌落直径显著增大, 色素减少, 分生孢子产量和萌发率均显著下降, 对胁迫反应的敏感性增强。进一步研究发现, 转化菌株分生孢子的细胞壁结构成分发生改变, 和分生孢子发育相关基因的表达被显著下调。提示草菇 VvLaeA 能提高球孢白僵菌菌株的生长速率, 而负调控色素沉积和分生孢子发育, 这为草菇基因功能鉴定提供了启示。

**关键词:** 球孢白僵菌; 草菇; VvlaeA; 分生孢子

## Effect of VvLaeA on the growth and development of *Beauveria bassiana*

CHEN Jinfeng<sup>1,2\*</sup>

1 College of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China

2 College of Modern Health Industry, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China

**Abstract:** It is unclear how VvLaeA functions in regulating the growth and development of

资助项目: 重庆市自然科学基金 (CSTB2022NSCQ-MSX0261); 重庆市教育委员会科学技术计划重点研究项目 (KJZD-K202201601)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2022NSCQ-MSX0261) and the Scientific and Technological Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (KJZD-K202201601).

\*Corresponding author. E-mail: chenjf@cque.edu.cn

Received: 2022-09-25; Accepted: 2022-10-27; Published online: 2022-11-01

*Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Sing.. Firstly, bioinformatics analysis of VvLaeA was carried out in this study. Subsequently, the *Vvgpd* promoter and the open reading frame (ORF) fragment of *VvlaeA* were amplified and fused by polymerase chain reaction (PCR). The fusion fragment was cloned into the pK2 (bar) plasmid. The recombinant construct pK2(bar)-OE*VvlaeA* was transfected into *Beauveria bassiana* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Finally, the growth and development of the transformants were examined. The results showed that VvLaeA shared a low homology with similar proteins in other fungi. Compared with the wild type, the colony diameter of the transformant was significantly increased. However, the pigment deposition, conidial yields and germination rates were significantly decreased. The overexpression strains were more sensitive to stresses than that of the wild type. Further studies showed the conidial cell wall properties of the transformants were altered, and the expressions of genes related to the conidial development were significantly down-regulated. Collectively, VvLaeA increased the growth rate of *B. bassiana* strains and negatively regulated the pigmentation and conidial development, which shed a light for the functional identification of straw mushroom genes.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*; *Volvariella volvacea*; VvLaeA; conidia

草菇 [*Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Sing.]是我国主栽食用菌之一,虽然近年来通过蛋白质组和转录组测序挖掘出一些有价值的信息<sup>[1-2]</sup>,但草菇的遗传转化难度大,菌种容易退化,基因功能鉴定困难。球孢白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin]是重要的生防菌,而且是一种研究基因功能的模式生物<sup>[3]</sup>。球孢白僵菌主要以分生孢子的形式进行无性繁殖,以菌丝体的形式进行营养生长<sup>[4-6]</sup>。在适宜的条件下,休眠的分生孢子吸水膨大萌发出芽管,进而延伸形成真菌菌丝。菌丝不断伸长分支进行营养生长,并相互交错缠绕形成菌丝体。伸长的菌丝体分化形成分生孢子梗,其上产生分生孢子<sup>[7]</sup>。在人工培养基上,球孢白僵菌的分生孢子至少需要 24 h 可以完全萌发,分生孢子数随着分生孢子梗数量的增加而不断升高,一周左右达到一个峰值<sup>[8]</sup>。当遭遇高温、高湿、营养缺乏等胁迫时,分生孢子通过形成细胞壁表面的棒状层和黑色素层来增加细胞结构的刚性,从而有利于休眠的分生孢子抵御外界不利环境<sup>[9-10]</sup>。当分生孢子附着在宿主主体壁上时,膨大形成附着胞和侵染钉,

通过物理膨压和降解宿主细胞壁成分进行侵染,进而形成菌丝体吸收宿主养分而导致宿主死亡<sup>[11]</sup>。分生孢子还可以直接萌发产生分生孢子,而不经菌丝体的方式进行微循环产孢<sup>[12]</sup>。分生孢子发育存在保守的中心途径 BrlA-AbaA-WetA,其中 BrlA 负责分生孢子梗的触发, ABA 负责分生孢子中后期的发育,而 WetA 调控分生孢子的成熟,中心途径中任何一个因子的缺失都将导致分生孢子发育受阻<sup>[13-14]</sup>。*brlA* 的表达受到全局性调控因子 LacA 的调控,  $\Delta$ *PolaeA* 敲除突变体的产孢量下调<sup>[15]</sup>,而超量表达 *CmlaeA* 能提高产孢量<sup>[16]</sup>。但对于草菇全局性调控因子 VvLaeA 的功能并不清楚。该研究通过农杆菌介导的方法将草菇 *VvlaeA* 转入球孢白僵菌中,实现了目的基因的超量表达,这一结果为草菇基因功能鉴定提供了启示。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株:草菇 V844 从广东揭阳锐一食用菌厂草菇子实体分离获得。球孢白僵菌菌株和载体 pK2(bar)、农杆菌 AGL-1 由西南大学生物技术中

心范艳华研究员惠赠。

培养基：大肠杆菌转化子用含有 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素的 LB (Luria-Bertani) 培养基进行筛选；农杆菌转化子用含有 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素的发根农杆菌培养基 (admingrobacterium rhizogene medium, YEB) 进行筛选；真菌转接到 1/4 倍的萨氏培养基 (sabouraud dextrose agar with yeast extract, SDAY)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA) 或查氏培养基 (czapek-dox medium, CZA) 上进行培养或表型鉴定。

其他试剂：聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物合成和基因测序由华大基因科技有限公司完成；Easstep<sup>TM</sup> 总 RNA 提取试剂盒，购自 Promage 公司；PrimeScript RT reagent Kit 反转录试剂盒，购自 TaKaRa 公司；2 $\times$ SYBR Green qPCR 混合液、Phanta Max Super Fidelity DNA Polymerase 和 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit，购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 PCR 融合片段合成

以草菇 DNA 为模板，*Vvgpd*-F/R 为引物，通过 PCR 方法扩增 *Vvgpd* 启动子。同时以草菇 cDNA 为模板，*VvlaeA*-F/R 为引物，通过 PCR 方法扩增草菇 *VvlaeA* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。最后以 *Vvgpd*-F/*VvlaeA*-R 为引物，以 *Vvgpd* 启动子和 *VvlaeA* 凝胶回收的片段为模板，进行融合 PCR 扩增目的片段。根据说明书的方法进行 PCR 反应样品的制备。PCR 反应程序为：95  $^{\circ}\text{C}$  3 min；95  $^{\circ}\text{C}$  15 s，58  $^{\circ}\text{C}$  15 s，72  $^{\circ}\text{C}$  1–2 min，30 个循环；72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。

### 1.2.2 重组载体的构建

将通过 PCR 扩增获得的融合片段和经过 *EcoR* I 酶切的 pK2(bar) 载体进行同源重组连接。根据说明书的要求进行反应混合液的制备，将反应混合液在 PCR 仪中 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 40 min，然后进

行转化试验。

### 1.2.3 农杆菌转化试验

将 200  $\mu\text{g}$  (3–5  $\mu\text{L}$ ) 质粒加入农杆菌感受态中，冰上放置 5 min，然后将感受态细胞加入电击杯中，在 2 200 V 电压下电击 3.5–5 ms。电击后，立即加入 1 mL 无抗的 YEB 培养基于电击杯中，然后将所得混合液吸入 1.5 mL 离心管中，在 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 2–3 h，吸取 30  $\mu\text{L}$  菌液涂布含有 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素的 YEB 固体培养基上，28  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 2 d，用 PCR 的方法进行转化子的筛选。

### 1.2.4 白僵菌转化试验

依据 Fang 等<sup>[17]</sup>的方法进行白僵菌转化。取在 IM 液体中经过 AS 诱导 6 h 的农杆菌 500  $\mu\text{L}$ ，加入等体积的球孢白僵菌分生孢子悬浮液 (浓度为  $5\times 10^4$  个/mL)，涡旋振荡混匀，涂布在铺有孔滤膜的 IM 培养基上，避光条件下培养 48 h。然后将微孔滤膜转移到提前加有头孢噻肟钠抗生素 (工作浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$ ) 和除草剂 PPT [18% (wt %)] 的草铵膦原溶液用无菌水稀释 4 倍，然后按照 1:1 000 的比例添加的 CZA 培养基上培养 5–7 d，直至有单菌落的出现。用牙签挑取单菌落接种至具有同样抗性的 48 孔板上进行再次筛选。用无菌牙签挑取生长在 48 孔板中的菌落，以菌丝裂解液为模板，进行 PCR 扩增验证潜在的阳性转化子。

### 1.2.5 菌落形态表型试验

取在 PDA 培养基上培养 10 d 左右的球孢白僵菌菌株，用 0.05% 吐温 80 重悬，双层擦镜纸过滤后获得分生孢子悬液，并调整浓度为  $5\times 10^6$  个/mL。取 2  $\mu\text{L}$  孢子悬液接种到 1/4 SDAY、PDA 和 CZA 培养基上，待孢子悬液被完全吸收后，将平板放置到 26  $^{\circ}\text{C}$  培养 10 d，进行菌落形态的观察，并测量菌落直径。

### 1.2.6 产孢量的测定

将分生孢子悬液浓度调整为  $1\times 10^7$  个/mL，按照 1:1 000 的体积比加入冷却到 55  $^{\circ}\text{C}$  左右的培养基中混合均匀，趁热配置平板，每个样重复

3次。将真菌在26℃下培养10d后,用直径1cm的打孔器将培养基连同真菌一起取下,充分进行涡旋振荡,制备分生孢子悬液,用血球计数板进行计数,统计分生孢子的产量。

### 1.2.7 萌发率测定

将分生孢子悬液调整浓度为 $1 \times 10^8$ 个/mL,然后涂布在CZA培养基上,26℃培养8–20h。每隔2h用锋利的刀片切取1cm×1cm大小的培养基块,用倒置显微镜进行观察拍照,计算分生孢子的萌发率。同时,添加终浓度为0.01g/100mL SDS或3.5% NaCl进行胁迫处理,在第15小时进行分生孢子萌发的观察和统计萌发率。

### 1.2.8 凝集素染色

按照 Wanchoo 等<sup>[18]</sup>的方法进行凝集素染色,取在PDA培养基上培养7d的菌株的分生孢子,调整孢悬液浓度为 $1 \times 10^8$ 个/mL,按照说明书的方法加入1–2μL凝集素染液,使凝集素的终浓度达到20μg/mL,在26℃条件下染色2–3h。染色结束后用中性PBS缓冲液洗涤2–3次,最后将分生孢子重悬于0.05%的吐温80溶液中,进行绿色荧光的观察。

### 1.2.9 分生孢子 RNA 的提取和反转录

取在CZA培养基上培养5d的菌株,液氮速冻后进行研磨,用RNA提取试剂盒进行RNA的提取,通过琼脂糖凝胶电泳进行RNA条带完整性的检测。利用反转录试剂盒进行反转录获得cDNA。

### 1.2.10 qPCR 方法

使用带有SYBR Green (Bio-Rad)的iCycler iQ多色实时PCR检测系统进行实时定量PCR。PCR反应体系(10μL):反应混合液5μL,上、下游引物(浓度为10μmol/L)0.5μL,稀释20倍的cDNA模板3μL,ddH<sub>2</sub>O 1μL,短暂离心混合均匀。PCR反应条件:95℃ 5min; 95℃ 15s, 60℃ 15s, 72℃ 30s, 39个循环。基因的相对表达量以*actin*或*Vvtublin*的表达量为参考进行确定,其中试验引物序列如表1所示。

## 2 结果与分析

### 2.1 草菇 VvLaeA 蛋白结构分析

生物信息学分析表明,VvLaeA蛋白序列由390个氨基酸残基(amino acids, AA)组成,分子量为43.9kDa,等电点pI为4.86。VvLaeA蛋白

表1 本文所用引物

Table 1 Primers used in the study

Name	Sequence (5'→3')
<i>qbrlA</i> -F	GACCAGTTCAACGACAAG
<i>qbrlA</i> -R	CAGTAATCTTCGTGCTTCTC
<i>qwetA</i> -F	CGCAGACGAATTTGACTT
<i>qbrlA</i> -R	GCTGGTGGTTGAATACAT
<i>qfilug</i> -F	TACCGAAGGTCAACAAGGGC
<i>qfilug</i> -R	AGACTGCTCCAATTCTGGGC
<i>qBBA_01877</i> -F	CCTCGTCTTTGAGTCGCAGT
<i>qBBA_01877</i> -R	AGTTCTGATTCTGGCCGACG
<i>qBBA_06297</i> -F	ATGTCACGACGCAGACTGTT
<i>qBBA_06297</i> -R	CTCGCACGATAGGCGTAAGT
<i>qVvLaeA</i> -F	TTCCACGCGTATGACCACAA
<i>qVvLaeA</i> -R	ACATCCTCAAATGCCGGGT
<i>Vvgpd</i> -F	CAGCTATGACCATGATTACGAATTCGGAATACTAACCCAGCAATC
<i>Vvgpd</i> -R	AAGGGCCCCAGTGGCGACATGATGACTTAGGTGCGTAGGAT
<i>VvLaeA</i> -F	ATCCTACGCACCTAAGTCATCATGTCGCCACTGGGCCCTT
<i>VvLaeA</i> -R	TCTTCTGTCGACACTAGTGAATTCTCATGATGACCGCTTTCTTG
<i>actin</i> -F	GTCAAGTCATCACCATTGGC
<i>actin</i> -R	GAGGAGCAATGATCTTGACC
<i>Vvtublin</i> -F	CCAACACTACCGCTATCTCC
<i>Vvtublin</i> -R	TTCACCTTCCTCCATACCTT

结构中包含由 88 个 aa 组成的甲基转移酶结构域 (152–239 aa), 其中在第 154–160 aa 区域、178–179 aa 区域、196–198 aa 区域和 215 aa 点处有多个 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 的结合位点(图 1A)。通过蛋白质系统发育树分析发现, VvLaeA 和其他真菌蛋白的同源性比较低, 其中与真姬菇(*Hypsizygus marmoreus*) HmLaeA 的同源性为 63.1%、与紫丁香蘑(*Lepista nuda*) LnLaeA 的同源性为 64.1%、与平滑白蛋巢菌(*Crucibulum laeve*) ClLaeA 的同源性为 62.9%、与灰光柄菇(*Pluteus cervinus*) PcLaeA 的同源性为 66.0%、与蛹虫草(*Cordyceps militaris*) CmLaeA 的同源性为 30.1%、与球孢白僵菌 BbLaeA 的同源性为 23.8% (图 1B)。

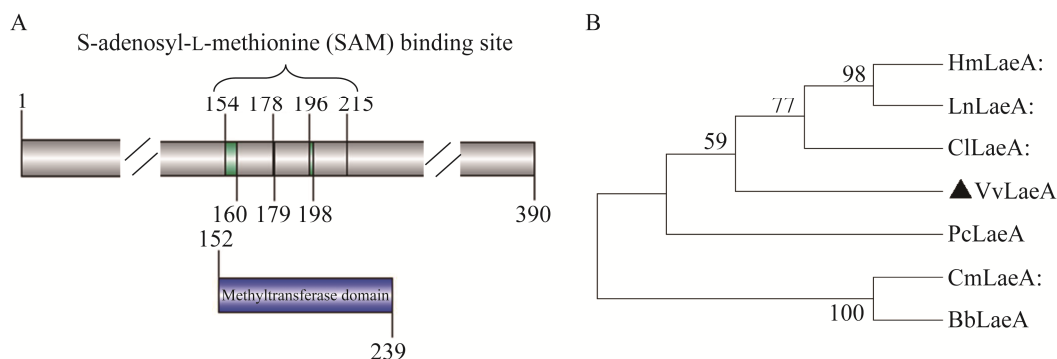
## 2.2 超表达载体的构建和白僵菌转化子的筛选

为了研究草菇 VvLaeA 的功能, 以模式生物球孢白僵菌为试验材料。将草菇的甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 *Vvgpd* 的启动子和 *VvLaeA* 基因

的 ORF 进行 PCR 融合, 然后和 pK2(bar) 载体进行同源重组连接, 经过 *EcoR* I 酶切初步获得重组载体 pK2(bar)-OE*VvLaeA* (图 2A), 并经测序进行确定, 然后转入农杆菌中。最后用转入重组载体的农杆菌去感染球孢白僵菌, 经过 RT-qPCR 确定 3 号和 4 号菌株中 *VvLaeA* 的表达量分别是 WT 的 3.0 倍和 2.7 倍(图 2B), 命名为 OE*VvLaeA*-1/2, 并作为后继试验的材料。

## 2.3 超量表达 *VvLaeA* 基因影响球孢白僵菌的菌落形态和产孢量

将超表达转化子 OE*VvLaeA*-1/2 的分生孢子分别接种到营养丰富的 1/4SDAY、PDA 和营养贫瘠的 CZA 培养基上, 26 °C 培养 10 d, 观察菌落形态并测量菌落的直径大小。结果显示, 和野生型(wild type, WT)相比, 转化子 OE*VvLaeA*-1/2 在 1/4SDAY 和 PDA 培养基上生长速度较快、菌落比较蓬松, 菌落直径是对照的 1.28–1.50 倍, 两者相比差异显著( $P < 0.05$ ); 而在 CZA 培养基上生长的超表达转化子和 WT 菌落的大小类似, 直径差异也并不显著( $P > 0.05$ ), 但转化子的色素沉积较少, 菌株颜色呈现白色(图 3A、3B)。



**图 1 VvLaeA 蛋白生物信息学分析** A: VvLaeA 蛋白结构, 具有 VvLaeA 的甲基转移酶保守结构域(蓝色柱子)和 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)结合位点(绿色柱子和竖线表示的位置)。B: VvLaeA 蛋白系统发育树分析

Figure 1 Bioinformatics analysis of VvLaeA protein sequence. A: Schematic representation of VvLaeA protein features. A methyltransferases domain (blue column), and putative S-adenosyl-L-methionine binding sites as indicated (green column/vertical lines). B: Phylogenetic tree analysis of VvLaeA.

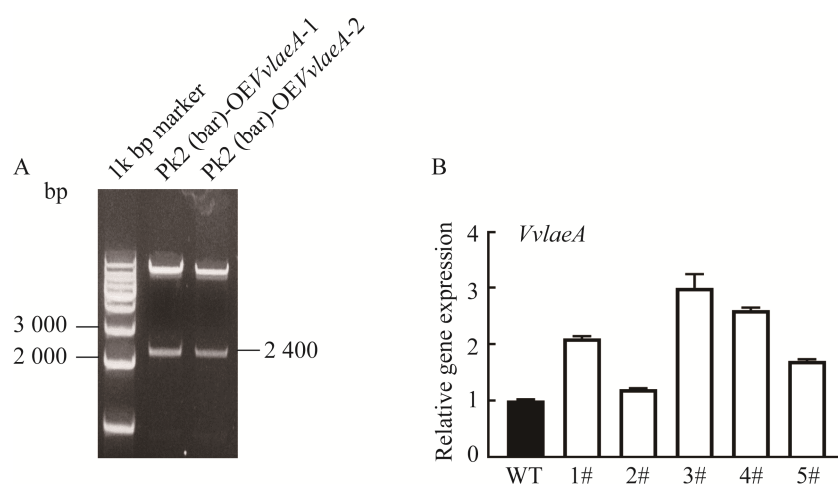


图2 超量表达载体的构建和超量表达菌株的筛选 A: 重组载体 pK2(bar)-OE *VvlaeA* 用 *EcoR* I 进行酶切验证的电泳图. B: 用 RT-qPCR 筛选在球孢白僵菌中超量表达草菇 *VvlaeA* 基因的转化子. #: 筛选的转化子

Figure 2 Construction of the overexpression vector OE *VvlaeA* and screening of overexpression strains. A: Electrophoretic diagram of recombinant vector pK2(bar)-OE *VvlaeA* verified by *EcoR* I digestion. B: Screening the transformants overexpressing *VvlaeA* gene in *B. bassiana* by RT-qPCR. #: Transgenic lines.

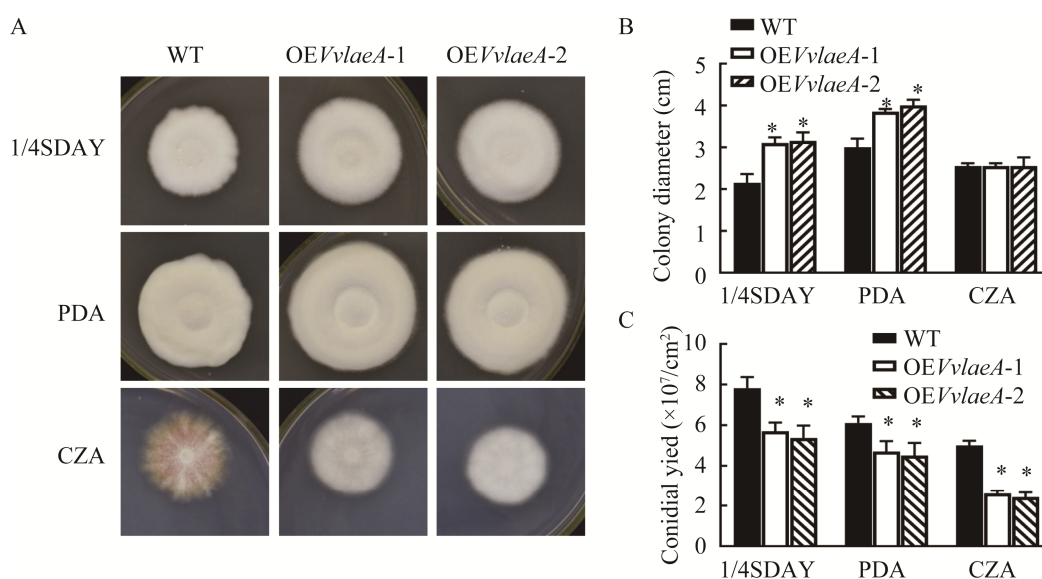


图3 超量表达菌株的表型分析 OE *VvlaeA* 转化子生长 10 d 的菌落的形态(A)、直径大小(B)和产孢量(C)的分析. \*:  $P < 0.05$

Figure 3 Phenotypic analysis of overexpressed strains. A: The growth of strains cultured at 26 °C for 10 d. Statistical analysis of fungal colony diameter (B) and conidial yields (C). \*:  $P < 0.05$ .

分生孢子产量的结果显示,在3种培养基上,转化子 *OEVvlaeA-1/2* 的产孢量比 WT 的要显著降低( $P<0.05$ ),特别在 CZA 培养基上, *OEVvlaeA-1/2* 的产孢量分别为  $2.6\times 10^7$  个/ $\text{cm}^2$  和  $2.42\times 10^7$  个/ $\text{cm}^2$ ,仅为 WT 产孢量的一半左右(图 3C)。

## 2.4 超表达 *VvlaeA* 基因降低球孢白僵菌的分生孢子萌发率

将 WT 和 *OEVvlaeA* 菌株的分生孢子涂布在 CZA 培养基上,培养 8 h 开始计算萌发率,直至 20 h 结束。*OEVvlaeA* 菌株分生孢子的萌发率达到 50% 的时间为 14 h,比 WT 分生孢子的萌发率(12 h)推迟了 2 h。在第 12、14 和 16 小时, *OEVvlaeA-2* 的萌发率分别比 WT 的萌发率低 19.7%、26.4% 和 23.0% ( $P<0.05$ ) (图 4A)。培养 15 h 时, *OEVvlaeA1/2* 在添加 0.01% SDS 和 3.5% NaCl 的 CZA 培养基上的萌发率,分别比 WT 萌发率平均低 35.0% 和 32.0% 左右 ( $P<0.05$ ) (图 4B)。

## 2.5 超表达 *VvlaeA* 基因改变球孢白僵菌分生孢子的细胞壁结构成分

细胞壁是真菌对抗外界胁迫的屏障,表面碳源是细胞壁和外界进行信息交流的重要成分,其中凝集素 WGA 与 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰神经氨酸残基进行特异性结合,而 GNL 与( $\alpha$ -1,3)甘露糖进行特异结合。凝集素染色结果显示,和 WT 的荧光强度相比, WGA 和 GNL 结合 *OEVvlaeA* 分生孢子细胞壁表面碳源较少,荧光强度较弱(图 5A)。同时,对细胞壁的 2 个特异蛋白的基因表达量进行检测, *OEVvlaeA* 转化子中 *BBA\_02697* 的表达量是 WT 的 2.7–3 倍,而 *BBA\_01877* 的表达量是 WT 的 0.4 倍左右(图 5B、5C)。

## 2.6 超表达 *VvlaeA* 基因下调球孢白僵菌分生孢子发育相关基因的表达

提取在 CZA 培养基上生长 5 d 的菌株 RNA,对 *OEVvlaeA* 转化子中和产孢相关基因的表达量进行检测。结果显示,转化子中 *Bbflug* 的表达量是 WT 的 0.45 倍左右, *Bbbra1A* 的表达量是 WT 的 0.7 倍左右, *BbwetA* 的表达量是 WT 的 0.36 倍左右(图 6)。

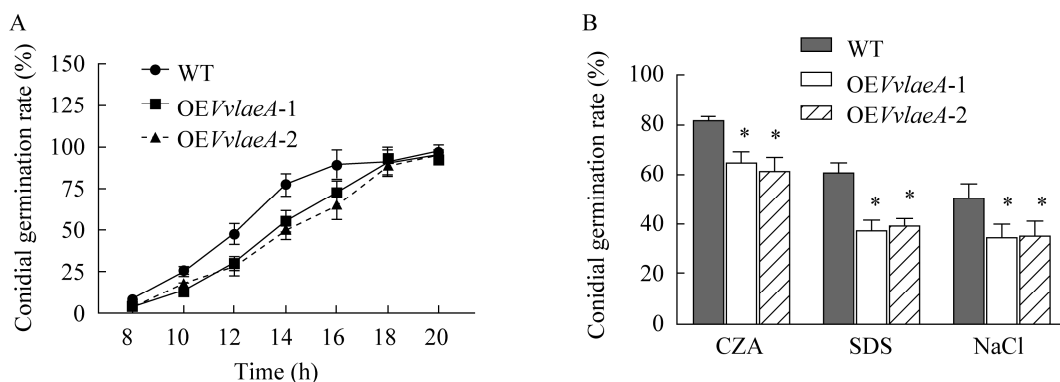


图 4 *OE VvlaeA* 转化子分生孢子的萌发率 A: 在 CZA 培养基上的萌发率. B: 在添加 0.01% SDS 和 3.5% NaCl 的萌发率. \*:  $P<0.05$

Figure 4 Conidial germination rates of *OE VvlaeA* strains. The germination rates under standardized condition (A), and 0.01% SDS or 3.5% NaCl stress (B). \*:  $P<0.05$ .



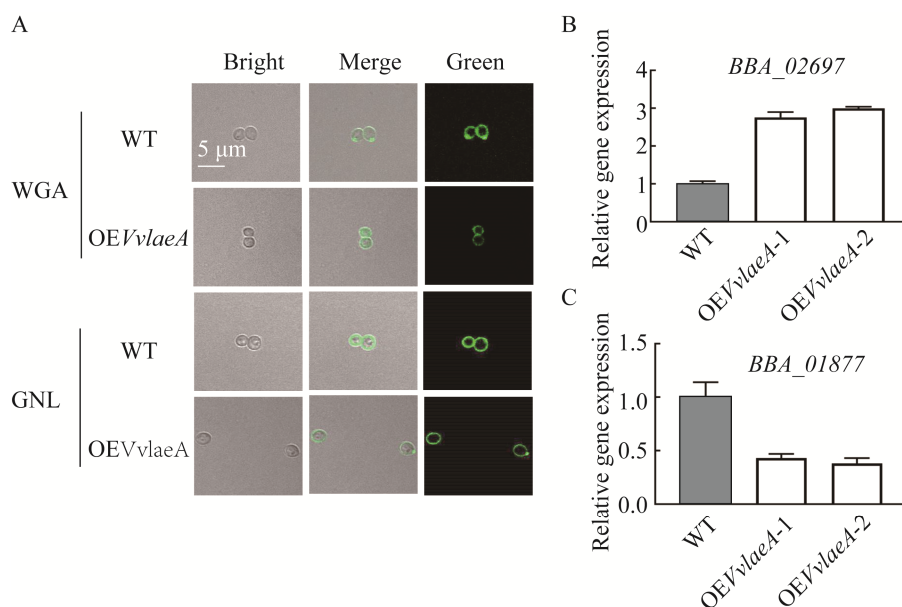


图5 细胞壁结构成分分析 A: OEVvlaeA 转化子分生孢子的凝集素染色. B-C: 细胞壁特异蛋白的基因表达分析

Figure 5 Analysis of the composition of conidial cell wall. A: Fluorescence images of lectin binding profiles of aerial conidia. Bar=5 μm. B-C: The mRNA level of conidial wall component genes in OEVvlaeA strain.

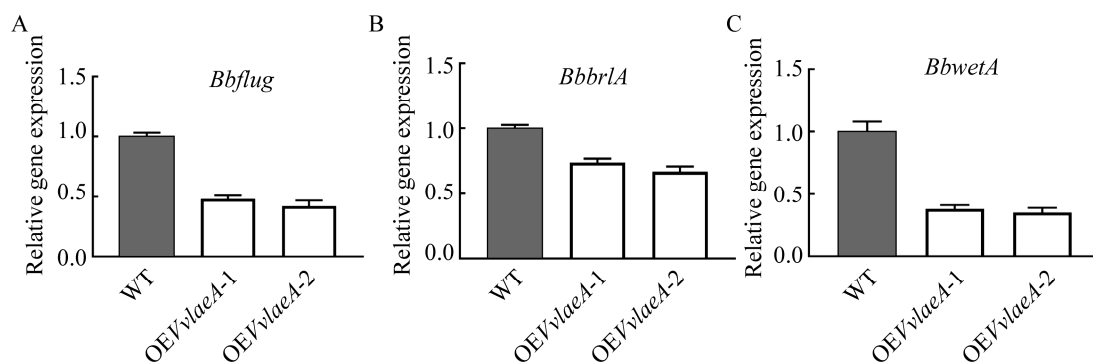


图6 OEVvlaeA 菌株中产孢相关基因的表达分析 提取在 CZA 培养基上培养 5 d 菌株中的 RNA, 检测 Bbflug (A)、BbbrlA (B)和 BbwetA (C)的表达量

Figure 6 Expression analyses of genes associated with conidial development in OEVvlaeA strains. Total RNA of fungal strains was extracted after culturing OEVvlaeA strain on CZA for 5 days and the relative expression levels of Bbflug (A), BbbrlA (B) and BbwetA (C) were analyzed.

### 3 讨论

草菇 VvLaeA 调控分生孢子发育和色素的沉积。草菇的 VvLaeA 与食用真菌蛋白的同源性为 60%–70%，与虫生真菌蛋白的同源性仅为

30%左右，但具有多个 SAM 结合位点，而 SAM 是一种常见的参与甲基转移的辅助底物。在转甲基化反应中，SAM 的甲基被转移到 DNA、磷脂和蛋白质等多种受体底物上，从而调控基因表达



和影响膜流动性,参与多种生理活动<sup>[19]</sup>。例如 SAM 合成的缺失或者甲基化途径被干扰都将导致神经精神等相关疾病的发生<sup>[20]</sup>,而马铃薯的甲基转移酶功能决定植株对病毒的抗性 or 易感性<sup>[21]</sup>。丝状真菌的甲基转移酶 LacA 作为全局性调控因子,调控多种次级代谢基因簇的表达和次级代谢产物的产生。在海洋类真菌中超量表达构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*) *laeA* 上调次生代谢产物合成基因的表达,引起乙酰胆碱酯酶抑制剂 A 合成的增加<sup>[22]</sup>。超量表达植物内生真菌球毛壳菌(*Chaetomium globosum*) *laeA* 基因的菌株增加了产孢量和色素含量<sup>[23]</sup>。病原真菌中 *laeA* 缺失的突变体往往显示出毒性和次级代谢降低<sup>[24]</sup>。例如球孢白僵菌中 *BblaeA* 的缺失导致了白僵菌素产量的降低,而 *BblaeA* 的过表达使其产量增加<sup>[25]</sup>。实验结果证实了草菇 *VvLaeA* 基因可以在模式生物球孢白僵菌中进行超量表达,能够调控球孢白僵菌的形态发生和分生孢子发育。此外,*VvLaeA* 影响球孢白僵菌的色素沉积,转化菌株的色素水平明显降低。

草菇 *VvLaeA* 调控发育与中心途径有关。分生孢子发育中心途径中 *BrlA* 能够触发分生孢子梗的发育,它的缺失导致分生孢子发育受阻<sup>[13-14]</sup>。病原真菌烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) *BrlA* 还可以调控次生代谢产物的生成,其基因的表达受到 *VvLaeA* 调控<sup>[26]</sup>。绿青霉菌(*Penicillium digitatum*)  $\Delta pdlaeA$  突变体的产孢量下降、对碱性胁迫敏感,产孢相关基因 *brlA*、*flbA*、*flbC*、*flbD* 和 *fluG* 的表达量均被下调<sup>[27]</sup>。孢子发育中心途径的下游因子 *WetA* 调控分生孢子的成熟,它的缺失引起细胞壁结构特异基因表达的下调和分生孢子产量的下降,以及菌株对胁迫反应的敏感性增加<sup>[8,28]</sup>。研究发现超量表达草菇 *VvLaeA* 基因的菌株中, *brlA*、*fluG* 和 *wetA* 的表达量被显著下调,分生孢子壁结构基因的表达也被显著

调控,这可能导致了转化子中产孢量的显著下降和分生孢子对胁迫反应的敏感性增加。

总之,在球孢白僵菌中成功表达了草菇的 *VvLaeA* 基因,为食用真菌基因的功能研究提供了新方法。同时,草菇 *VvLaeA* 是球孢白僵菌发育和色素沉积的一个负调控因子,为虫生真菌分生孢子发育和次生代谢产物调控的研究提供了新材料。

## REFERENCES

- [1] LI P, HU C, LI Y, GE L, WU G, LV B, JIANG W, XI D. The cold-resistance mechanism of a mutagenic *Volvariella volvacea* strain VH3 with outstanding traits revealed by transcriptome profiling[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 336-344.
- [2] ZHA L, CHEN M, YU C, GUO Q, ZHAO X, LI Z, ZHAO Y, LI C, YANG H. Differential proteomics study of postharvest *Volvariella volvacea* during storage at 4 °C[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 13134-13156.
- [3] ZHANG S, FAN Y, XIA YX, KEYHANI NO. Sulfonylurea resistance as a new selectable marker for the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 1151-1156.
- [4] TONG SM, FENG MG. Phenotypic and molecular insights into heat tolerance of formulated cells as active ingredients of fungal insecticides[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(13): 5711-5724.
- [5] LOPEZ-PEREZ M, RODRIGUEZ-GOMEZ D, LOERA O. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives[J]. Critical Reviews In Biotechnology, 2015, 35(3): 334-341.
- [6] MASCARIN GM, JARONSKI ST. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(11): 177-202.
- [7] QIU L, ZHANG TS, SONG JZ, ZHANG J, LI Z, WANG JJ. BbWor1, a regulator of morphological transition, is involved in conidium-hypha switching, blastospore propagation, and virulence in *Beauveria bassiana*[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(1): e0020321.
- [8] LI F, SHI HQ, YING SH, FENG MG. WetA and VosA are distinct regulators of conidiation capacity, conidial quality, and biological control potential of a fungal insect pathogen[J]. Applied Microbiology and

- Biotechnology, 2015, 99(23): 10069-10081.
- [9] BALTUSSEN TJH, ZOLL J, VERWEIJ PE, MELCHERS WJG. Molecular mechanisms of conidial germination in *Aspergillus* spp[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2019, 84(1): e00049-19.
  - [10] BALL SR, KWAN AH, SUNDE M. Hydrophobin rodlets on the fungal cell wall[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2020, 425: 29-51.
  - [11] BUTT TM, COATES CJ, DUBOVSKIY IM, RATCLIFFE NA. Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions[J]. Advances in Genetics, 2016, 94: 307-364.
  - [12] JUNG B, KIM S, LEE J. Microcycle conidiation in filamentous fungi[J]. Mycobiology, 2014, 42(1): 1-5.
  - [13] CHEN JF, LIU Y, TANG GR, JIN D, CHEN X, PEI Y, FAN YH. The secondary metabolite regulator, BbSmr1, is a central regulator of conidiation via the BrlA-AbaA-WetA pathway in *Beauveria bassiana*[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(2): 810-825.
  - [14] ZHANG AX, MOUHOUMED AZ, TONG SM, YING SH, FENG MG. BrlA and AbaA govern virulence-required dimorphic switch, conidiation, and pathogenicity in a fungal insect pathogen[J]. mSystems, 2019, 4(4): e00140-19.
  - [15] ZHANG X, ZHU Y, BAO L, GAO L, YAO G, LI Y, YANG Z, LI Z, ZHONG Y, LI F, YIN H, QU Y, QIN Y. Putative methyltransferase LaeA and transcription factor CreA are necessary for proper asexual development and controlling secondary metabolic gene cluster expression[J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 94: 32-46.
  - [16] 汪滢, 杨占山, 鲍大鹏, 李燕, 吴莹莹, 邹根. 全局调控因子 LaeA 对蛹虫草生长发育和次生代谢的作用[J]. 食用菌学报, 2022, 29(1): 20-26.
  - WANG Y, YANG ZS, BAO DP, L Y, WU YY, ZOU G. Effects of LaeA on growth, development and secondary metabolism of *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Edible Fungi, 2022, 29(1): 20-26 (in Chinese).
  - [17] FANG W, ZHANG Y, YANG X, ZHENG X, DUAN H, LI Y, PEI Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2004, 85(1): 18-24.
  - [18] WANCHOO A, LEWIS MW, KEYHANI NO. Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in *in vitro* and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Microbiology, 2009, 155(Pt 9): 3121-3133.
  - [19] LU SC. S-adenosylmethionine[J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2000, 32(4): 391-395.
  - [20] GAO J, CAHILL CM, HUANG X, ROFFMAN JL, LAMON-FAVA S, FAVA M, MISCHOULON D, ROGERS JT. S-adenosyl methionine and transmethylation pathways in neuropsychiatric diseases throughout life[J]. Neurotherapeutics, 2018, 15(1): 156-175.
  - [21] SPECHENKOVA N, FESENKO IA, MAMAEVA A, SUPRUNOVA TP, KALININA NO, LOVE AJ, TALIANSKY M. The resistance responses of potato plants to potato virus Y are associated with an increased cellular methionine content and an altered SAM: SAH methylation index[J]. Viruses, 2021, 13(6): 955-970.
  - [22] KHAN I, XIE WL, YU YC, SHENG H, XU Y, WANG JQ, DEBNATH SC, XU JZ, ZHENG DQ, DING WJ, WANG PM. Heteroexpression of *Aspergillus nidulans* LaeA in marine-derived fungi triggers upregulation of secondary metabolite biosynthetic genes[J]. Marine Drugs, 2020, 18(12): 652-669.
  - [23] CHENG M, ZHAO S, LIN C, SONG J, YANG Q. Requirement of LaeA for sporulation, pigmentation and secondary metabolism in *Chaetomium globosum*[J]. Fungal Biology, 2021, 125(4): 305-315.
  - [24] PATANANAN AN, PALMER JM, GARVEY GS, KELLER NP, CLARKE SG. A novel automethylation reaction in the *Aspergillus nidulans* LaeA protein generates S-methylmethionine[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(20): 14032-14045.
  - [25] YIN M, XIAO D, WANG C, ZHANG L, DUN B, YUE Q. The regulation of BbLaeA on the production of beauvericin and bassiatin in *Beauveria bassiana*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 38: 1-10.
  - [26] LIND AL, LIM FY, SOUKUP AA, KELLER NP, ROKAS A. An LaeA- and BrlA-dependent cellular network governs tissue-specific secondary metabolism in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*[J]. mSphere, 2018, 3(2): e00050-18.
  - [27] ZHU C, WANG Y, HU X, LEI M, WANG M, ZENG J, LI H, LIU Z, ZHOU T, YU D. Involvement of LaeA in the regulation of conidia production and stress responses in *Penicillium digitatum*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2020, 60(1): 82-88.
  - [28] CHEN JF, TAN JJ, WANG JY, MAO AJ, XU XP, ZHANG Y, ZHENG XL, LIU Y, JIN D, LI XB, FAN YH. The zinc finger transcription factor BbCmr1 regulates conidium maturation in *Beauveria bassiana*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(1): e0206621.

(本文责编 陈宏宇)