

绿僵菌微循环产孢基因 *Pyk* 的克隆及 RNA 干扰分析

徐飞 彭国雄 夏玉先*

(重庆大学生物工程学院基因工程研究中心 重庆市杀虫真菌农药工程研究中心 重庆 400030)

摘要: 微循环产孢是真菌遭遇逆境时发生的一种产孢机制, 具有繁殖快速及抗逆性强等诸多优点。研究绿僵菌的微循环产孢机制并加以利用, 对增强该菌在生物防治中的应用效果具有重要的意义。采用绿僵菌基因组数据库与 NCBI 数据库中同源蛋白比对获得 *Pyk* 基因 DNA 序列; 分析 *Pyk* 基因结构并设计引物, 通过 RT-PCR 扩增克隆 *Pyk* 全长 cDNA 序列。序列分析显示该基因 cDNA 全长 1 934 bp, 开放阅读框长为 1 752 bp (GenBank 登录号: HQ153828), 编码产物为 583 个氨基酸的丙酮酸激酶, 该酶与子囊菌门中其他真菌具有较高的相似性(57%–77%)。构建 *Pyk* 基因的 RNAi 载体, 基因枪转化野生型绿僵菌获得 3 个突变菌株, RT-PCR 证实 3 个干扰突变菌株中 *Pyk* 基因的干扰效率分别为: 51%、56%、33%。对突变菌株的微循环产孢模式做了进一步分析, 结果显示: 与野生菌株相比, 突变菌株产生更多的孢子形态类型, 菌落周边的白色菌丝也相对较少。

关键词: 虫生真菌, 微循环产孢, 丙酮酸激酶, RNA 干扰

Cloning and analysis by RNAi of a pyruvate kinase gene expressed during microcycle conidiation in *Metarhizium ansopliae*

XU Fei PENG Guo-Xiong XIA Yu-Xian*

(Genetic Engineering Research Center of Bioengineering college, Chongqing University, Chongqing Engineering Research Center for Fungal Insecticides, Chongqing 400030, China)

Abstract: Microcycle conidiation has been proposed as an advantageous conidiation pattern for fungus with rapid propagation and strong resistance to stress factors. Deeply understand the microcycle conidiation mechanism will greatly enhance the potential of entomopathogenic fungi in biocontrol. Here, we isolated a microcycle conidiation associated gene, *Pyk*, in *Metarhizium ansopliae* and obtained its

full length of DNA and cDNA sequence. *Pyk* gene in *M. anisopliae* encoded a homolog of pyruvate kinase with 583 amino acid residues, which showed a highly resemblance to that of other species in ascomycota (57%–77% identity). To clarify its role in microcycle conidiation, we constructed a *Pyk*-RNAi vector to knockdown *Pyk* transcript. RT-PCR demonstrated a reduced expression in mRNA level in three mutants. Furthermore, we analyzed suppression effect to *Pyk* in mutations. The mutants showed more varied shapes of conidia and less white hypha in colonial morphology compared to wild type.

Keywords: Entomopathogenic fungus, Microcycle conidiation, Pyruvate kinase, RNA interference

关于丝状真菌的产孢过程在模式生物构巢曲霉中已得到详细的阐明^[1]。产孢是真菌体内一个非常复杂的生理过程,涉及基因时空特异性表达、细胞特化、细胞间相互关系等。简单地说,真菌生长过程主要分为3个阶段:(1)休眠期的孢子获得外界的诱导信号进行萌发,形成芽管;(2)芽管继续进行营养生长,形成菌丝;(3)菌丝顶端或是侧端产生子代孢子,子代孢子继续下一轮繁殖循环^[2]。孢子产生过程是真菌生长周期中的一个阶段。

然而,真菌除了正常的产孢模式外,微循环产孢作为真菌的另一种产孢模式越来越引起重视。微循环产孢首次在黑曲霉中被发现,1971年Anderson发现当黑曲霉孢子经过高温刺激后再放至低温时,孢子能够直接产生孢子,而绕过了菌丝生长阶段^[3]。随后通过同样的策略或是其他方法,如光、高密度接种、营养缺失等在不同物种中诱导出了微循环产孢现象。迄今为止,已在100多个物种中报道了微循环产孢现象^[4-5]。但是,以前的研究均局限于对微循环产孢诱导条件的探索,关于其调控的分子机制研究很少。目前,仅有3个微循环产孢特异调控基因及其功能的报道:粗糙脉胞菌中的 *mcb*、*mcm*^[6]和绿僵菌中的 *ccg*^[7]。

绿僵菌是一种重要的昆虫病原真菌,具有体壁穿透、特异性强、害虫不易产生抗药性等优点,是目前广泛应用的微生物农药之一^[8-9],产孢能力和孢子特性直接影响着绿僵菌的商业化生产及田间防效。我们在一种固体培养基上诱导了绿僵菌的微循环产孢现象并发现其诸多优良特性^[16],并通过抑制性差减杂交的方法构建了微循环产孢时期特异高表达基因的差减文库,分离了119条特异表达的基因^[10]。本研究克隆了微循环产孢时期一个高表达

基因 *Pyk*, 并通过 RNAi 的方法分析了其对产孢模式的可能影响。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株及培养基

1.1.1 供试菌株: 绿僵菌 CQMa102 (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*)。大肠杆菌 JM109 购自博大泰克公司。

1.1.2 培养基: LB 培养基(*W/V*): 1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 0.5% NaCl, 固体培养基加琼脂 15 g/L, pH 7.0。查氏培养基(*g/L*): NaNO₃ 2, K₂HPO₄ 1, KCl 0.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.01, 蔗糖 30, 琼脂 15, pH 6.7。SYA 培养基^[10]。1/4 SDA 培养基^[14]。

1.2 主要试剂及仪器

PCR 扩增试剂、Marker 均购自鼎国生物技术(北京)有限公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, DNA 基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司,引物合成及测序由上海生物工程有限公司完成。Thermal Cycler PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪、基因枪设备均购自美国 Bio-Rad 公司, Motic 光学数码显微镜购自麦克奥迪实业集团有限公司。

1.3 绿僵菌 *Pyk* 基因的克隆

1.3.1 EST 序列分析及 BLAST 比对: 根据所构建的绿僵菌微循环产孢时期的差减文库,挑选高表达的 EST 序列(FC809369), NCBI 比对发现该基因序列与 *Chaetomium globosum* 中的丙酮酸激酶基因的相似性非常高($E=4.00 \times 10^{-57}$)。

1.3.2 绿僵菌微循环产孢时期总 RNA 的提取及 cDNA 第一链合成: 根据 Trizol 总 RNA 提取说明书,提取绿僵菌野生菌株和干扰菌株微循环产孢时期

(24 h)总 RNA, 并反转录合成 cDNA 第一链。

1.3.3 *Pyk* 基因组 DNA 及全长 cDNA 序列的获取:

本课题组已经将绿僵菌基因组全部测序, 通过 EST 序列与 NCBI 数据库中已公布的丙酮酸激酶蛋白序列进行比对、分析, 获得 *Pyk* 基因的 DNA 序列。分析其可能的开放 ORF, 设计引物 *Pyk*-F (5'-CGCAG CCGTTCATTTAGCA-3')和 *Pyk*-R (5'-TTGTTCTCG TTCCCGTTCC-3'), 以 cDNA 第一链为模板扩增其 cDNA 全长, PCR 程序为: 95 °C 4 min; 95 °C 30 s, 57.2 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 8 min。PCR 产物进行电泳、切胶回收, 连接 PMD-19T 载体, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 测序获得其 cDNA 序列。

1.3.4 *Pyk* 基因 cDNA 结构分析: 将 cDNA 序列与基因组序列进行对比, 分析其内含子分布; 根据 NCBI 网站及 <http://www.expasy.org> 提供的生物信息进行在线分析。

1.4 *Pyk* 基因的干扰及其产孢模式分析

1.4.1 RNAi 干扰载体构建: 构建了一个绿僵菌基因功能分析的双启动子干扰载体 pDPB^[7], 该载体主要包括一个 *bar* 基因筛选标记、Amp 筛选标记及一对双启动子(Pgpd 和 Ptrpc), 其结构信息如图 1 所示。为进行高效的小链 RNA 干扰, 我们在 http://www.flyrnai.org/cgi-bin/RNAi_find_primers.pl 分析了其有效的干扰区域(1 086-1 543 bp)设计了干扰区域的特异引物, 其引物序列信息为: RNAi-*Pyk* (F):

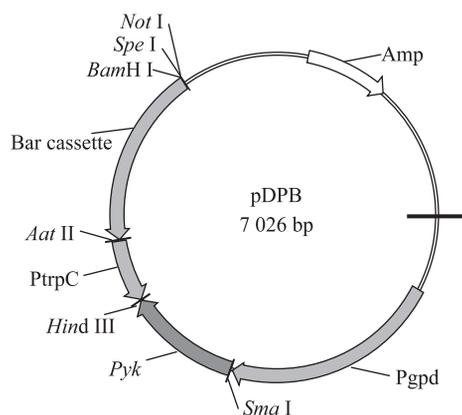


图 1 RNAi-*Pyk* 干扰载体构建图谱

Fig. 1 Schematic map for RNAi-*Pyk* vector construction

5'-CCCAAGCTTGGGCCAGGGCTTGAACAAC-3'; RNAi-*Pyk* (R): 5'-TCCCCCGGGGAAATGGAT AGACTCCACGAT-3'. PCR 扩增特异的干扰片段 (1 045-1 639 bp)后, 分别用 *Hind* III和 *Sma* I 双酶切目的条带与干扰载体, 进行连接、转化, 筛选阳性克隆, 按小量质粒提取试剂盒说明书进行 pDPB-*Pyk* 质粒提取。

1.4.2 *Pyk* 干扰载体的真菌转化: pDPB-*Pyk* 质粒 DNA 用 *Spe* I 进行线性化后, 用基因枪方法^[11]转化野生型绿僵菌。由于 RNAi 载体含有除草剂抗性基因, 转入宿主菌后可增强其抗除草剂的能力。给培养基以金龟子绿僵菌出发菌株孢子生长受抑制的除草剂浓度, 可以达到筛选转化子的目的。根据 Bernier 等^[12]和 Goettel 等^[13]描述的方法进行稳定转化子的筛选。转化子于含有 100 mg/L 除草剂的查氏培养基上培养 6 d 后, 挑取生长状态良好的菌落接种于含有除草剂的查氏培养基上划线分离以得到纯的单菌落, 然后把单菌落接种于不含除草剂的 1/4 SDA 培养基上, 28 °C 黑暗培养。如此重复转接 5 次, 再挑选单菌落接种到含除草剂的 1/4 SDA 培养基上。按真菌基因组提取试剂盒的操作说明提取稳定遗传转化子的基因组, 根据干扰载体双启动子区域设计验证引物 Pgpd-f/Ptrp-r, 引物信息为: Pgpd-f: 5'-AACACCCACATTTCCGCATTC-3'; Ptrp-r: 5'-TCGCCAGCAAAGTAGCATA-3'。对筛选培养基上生长的菌株进一步进行 PCR 验证, PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.4.3 RT-PCR 测定转化菌株干扰效率: 设计 *Pyk* 的定量引物 Q-*Pyk*-F (5'-GACACGGAATGCCACA A-3')和 Q-*Pyk*-R (5'-ACAGCCCACTTGATACGC-3'); 同时以三磷酸甘油醛脱氢酶基因作为内参基因, 设计的内参引物: GAPDH (F): (5'-GACTGCCCGCATT GAGAAG-3'); GAPDH (R): (5'-AGATGGAGGAG TTGGTGTG-3')。分别以野生菌株和 3 个干扰菌株反转录合成的 cDNA 第一链为模板用 iCycler™ Real Time PCR System 进行定量 PCR 扩增。反应混合液为 SYBR® Premix Ex Taq™ Master Mix Kit (TaKaRa, Japan)提供。反应体系为(20 μL): 2×SYBR® Premix Ex Taq™ Master Mix, GAPDH

引物、Pyk 特异引物(终浓度分别为 0.1、0.2、0.2 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL cDNA。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 40 个循环。为了确保结果的可重复性, 每个反应设置 3 次样品重复。PCR 扩增结束后立即进行熔解曲线分析, 以验证扩增的特异性。熔解曲线的程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 从 55 $^{\circ}\text{C}$ 开始每升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 s, 连续升高 80 次(到 95 $^{\circ}\text{C}$ 为止)。为了确定 Pyk 与 GAPDH 的扩增效率是否相近, Pyk 基因 cDNA 模板被稀释用以制作标准曲线。Pyk 转录本的表达差异通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。

1.4.4 转化菌株产孢模式分析: 分别将野生型绿僵菌和 RNAi-Pyk 稳定的转化菌株培养于微循环产孢培养基 SYA 中, 0–32 h 过程中观察其产孢方式, 5–10 d 观察其菌落形态。孢子大小测定采用数码光学显微镜中的测量工具(MOTIC, 中国)。

2 结果与分析

2.1 绿僵菌 Pyk 基因 cDNA 全长序列的克隆

克隆了 Pyk 基因及其上下游调控序列, 已提交到 NCBI GenBank 数据库, 登录号为 HQ153828。该基因全长 cDNA 全长 1 934 bp, 开放阅读框长 1 752 bp, 起始密码子 ATG 位于 107 bp 处, ATG 密码

子附近符合 Kozak 规则^[14] (AXXATGG), 终止密码子位于 1 858 bp 处, 编码 583 个氨基酸, 3'端有 PolyA 尾。相对分子量为 47.8 kD, 等电点(pI)为 9.73, 为碱性蛋白。此外, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>对编码的氨基酸序列进行分析, 发现并无信号肽序列。

2.2 Pyk 蛋白进化关系分析

绿僵菌 Pyk 基因提供了第一个昆虫病原真菌丙酮酸激酶的全长序列, 在 NCBI 上的 BLASTp 分析显示了该基因编码产物与其他蛋白的同源关系, 比对数据显示该基因广泛存在于细菌、真菌、动物中。绿僵菌属于子囊菌门, Pyk 基因与该门中其他真菌的丙酮酸激酶具有较高的相似性。为此, 选择了该门中的 17 种真菌进行了进化关系分析, 结果显示该蛋白产物(丙酮酸激酶)与子囊菌门中的盘菌亚门具有相对较高的相似性, 在所选物种中相似性为 63%–77%, 其中与 *Gibberella zeae* 相似性最高: 77%。而与酵母菌亚门、外囊菌亚门的相似性均为 57%左右(图 2)。进一步用 PSI-BLAST 软件对 Pyk 的同源序列进行比对, 发现同源区域主要集中于 C 端, 该区域主要为丙酮酸激酶的催化区域, 而在 N 端保守序列相对较少, 中间一段氨基酸序列在不同物种中差异性非常大(图略)。

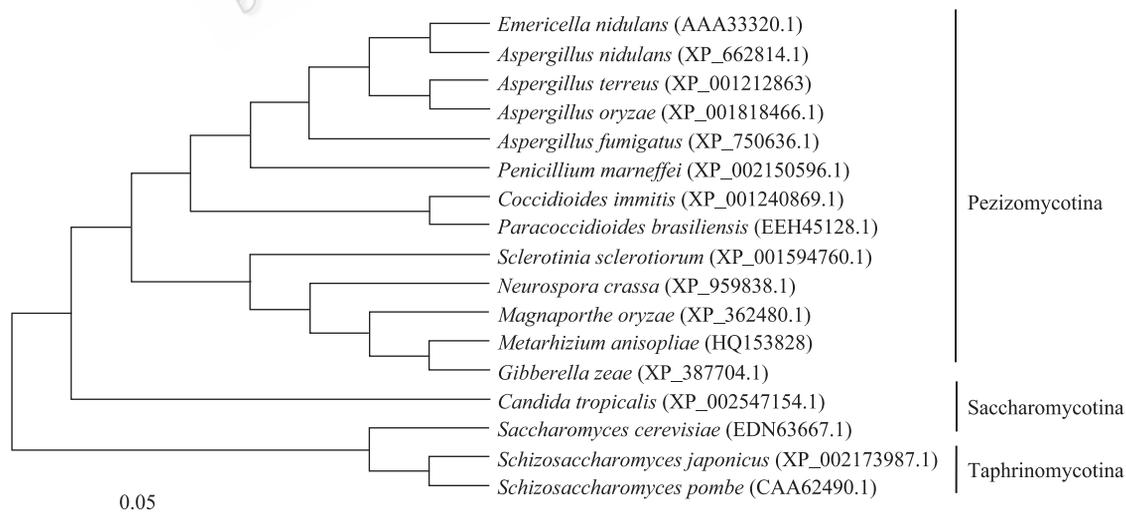


图 2 不同真菌物种中 Pyk 丙酮酸激酶的进化关系

Fig. 2 Phylogenetic relationship of Pyk in fungal homologs

Note: Bar (0.05), 5 nucleotide substitution per 100 nucleotides of Pyk sequence. Strain names are shown next to the organism names and GenBank accession numbers for the Pyk sequences used are given in parentheses.

2.3 *Pyk* 基因的干扰及其产孢模式分析

2.3.1 稳定转化子的筛选及 PCR 验证: 将通过 Bar 基因在含有除草剂的查氏培养基上筛到的菌株, 在不含除草剂的 1/4 SDA 培养基上进行遗传稳定性实验, 将稳定遗传的转化子用双启动子引物 P_{gpd-f}/P_{trp-r} 进行 PCR 扩增, PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析(图 3)。如果载有 *Pyk* 干扰片段的干扰载体能够成功整合到野生型绿僵菌基因组, 则用干扰载体双启动子引物进行 PCR 验证时, 能扩增出启动子之间插入的 *Pyk* 干扰片段(594 bp), 而假阳性则 PCR 扩增不出产物或是产物大小不一致。电泳结果表明: 3 个转化菌株验证的干扰区域片段与阳性对照大小一致, 表明载有 *Pyk* 基因的干扰载体已经成功整合到了绿僵菌基因组。

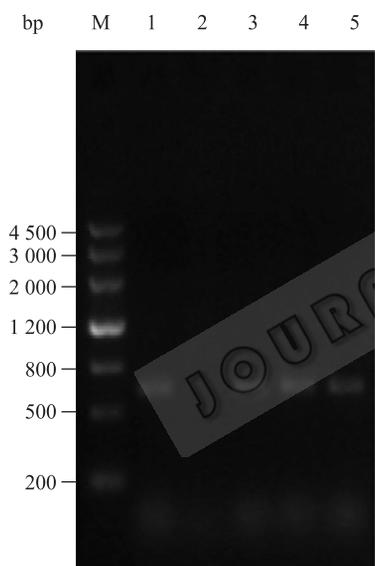


图 3 *Pyk* 基因干扰转化菌株验证

Fig. 3 PCR confirmation to mutants

Note: M: DNA marker; 1: Positive control; 2: Wild type; 3-5: Independent transformant.

2.3.2 转化菌株中 *Pyk* 基因干扰效率分析: 为了验证 3 个干扰菌株中该基因是否被干扰, 用实时荧光定量 PCR 分析了干扰菌株中 *Pyk* 基因 mRNA 水平上的表达。结果显示, 与野生型菌株 *Pyk* 基因表达水平相比(100%), 3 个干扰菌株中 *Pyk* 基因的表达水平出现一定的下降, 其干扰效率分别为: 51%、56%、33%, 表明该基因已被成功干扰(图 4)。

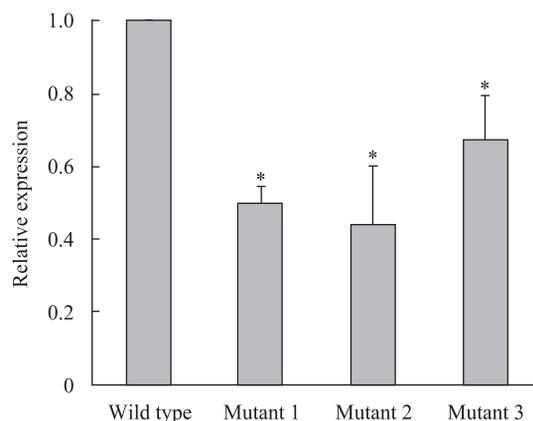


图 4 野生菌株与干扰菌株中 *Pyk* 基因相对表达差异

Fig. 4 Relative gene expression of *Pyk* in RNAi-*Pyk* mutants against the wild type calibrated as 100%

Note: *: Significant difference at $P < 0.05$. Error bars are standard deviations of three trials.

2.3.3 *Pyk* 基因被干扰后对微循环产孢模式的影响:

微循环产孢一般在 8 h 内孢子萌发形成萌发管, 然后萌发管膨大, 在 16 h 时子代孢子开始形成, 在 24 h 时处于大量孢子产生时期。在显微镜下观察野生菌株和干扰菌株在 0-32 h 内的产孢情况发现, 野生菌株和干扰菌株均进行微循环产孢, 产孢模式未发生显著性改变; 但是, 干扰菌株产生的孢子形态发生了变化, 大小分布更不规则, 其长宽比分布范围为 1.21-1.93, 可以分为椭圆状和长棒状 2 种, 而野生菌株产生的孢子长宽比分布范围为 1.30-1.52, 普遍为椭圆状。野生菌株和干扰菌株在微循环产孢培养基上培养 10 d 内, 在菌落形态上和菌落大小上并无特别显著的差异产生; 但是与野生菌株相比, 干扰菌株菌丝长度相对较短, 干扰菌株与野生菌株的白色菌丝平均长度分别为 0.31 cm 和 0.17 cm(图 5)。

3 讨论

研究发现, 一部分丝状真菌能进行 2 种产孢方式: 正常产孢及微循环产孢。而微循环产孢是真菌遭遇逆境时发生的一种罕见的生存机制, 这 2 种产孢方式均存在于绿僵菌中^[10,15]。与正常产孢相比, 微循环产孢无论是在产孢速度还是在产孢总量上都显示了极为明显的优势^[16], 这对农业病虫害的防治具有非常重要的应用价值。在这里我们首次克隆绿

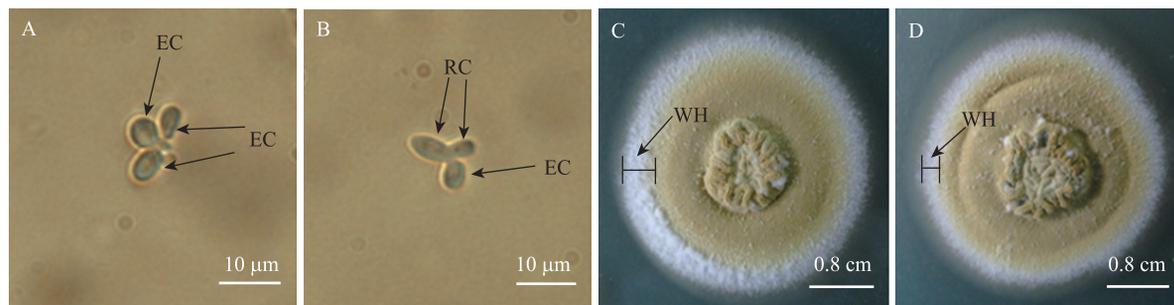


图5 野生菌株和干扰菌株的孢子($\times 400$)及菌落形态分析

Fig. 5 Spore morphology ($\times 400$) and colonies morphology

Note: A: Conidia of wild type strain after 24 h incubation in SYA; B: Conidia of RNAi-*Pyk* strain after 24 h incubation in SYA; C: Colonies morphology of wild type strain after 10 d incubation in SYA; D: Colonies morphology of RNAi-*Pyk* strain after 10 d incubation in SYA. EC: Ellipsoid conidia; RC: Rod-like conidia; WH: White hypha.

僵菌微循环产孢过程中一个高表达的基因丙酮酸激酶基因 *Pyk*。

丙酮酸激酶分解磷酸丙酮酸产生丙酮酸, 同时 ADP 生成 ATP, 是糖酵解代谢中最后一步, 也是产生能量的一步。该反应在体内为不可逆反应, 且是葡萄糖代谢途径的一个调控步骤。关于该酶的结构及特性已经在酵母、细菌中得到详细的研究^[17-18]。除了普遍地参与细胞的能量代谢外, 此酶也被报道有一些特定的功能, 如在烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 中, 丙酮酸激酶基因与烟曲霉毒素 B 的合成直接相关, 它催化烟曲霉毒素 B 合成的最后一步反应, 该基因缺失会导致烟曲霉毒力的降低^[19]。在酵母中发现一种 *Pyk* 突变株, 当培养基中 C 源下降的时候, 丙酮酸激酶活性极大地减少, 并引起了一系列基因表达的变化, 表明 *Pyk* 基因可能是 C 源的感受因子^[20]。微循环产孢培养基区别于正常产孢培养基的最大区别在于 C 源和 N 源, 微循环产孢文库中发现此基因, 预示着该基因可能拥有一些参与微循环产孢模式调控的功能。目前, *Pyk* 基因参与生物体其他方面的功能发现得比较少。因此, *Pyk* 基因的成功克隆及功能初步分析对以后研究该基因在病原真菌生长发育及病原性方面起着重要的作用。

我们克隆了丙酮酸激酶 *Pyk* 的全长序列, 并对该基因的结构序列做了一些生物信息学分析。该基因的结构与其他物种具有极大的相似性, 也与其功能具有一致联系, 如该基因编码 583 aa、与进行比

对的 17 种物种具有较强的保守区域等。这些区域集中在 C 端和 N 端, 主要为酶活性区域, 但 C 端和 N 端中间一段区域不同物种中差异非常大, 表明 *Pyk* 基因在不同物种中除了保守的功能外, 可能存在一些特异的功能。信号肽预测显示该基因并无信号肽, 意味着该蛋白无分泌特性, 这与该酶参与的糖酵解功能完全吻合, 停留在细胞液中。

RNAi 技术是目前研究基因功能的一种常用技术^[21]。除此之外, 基因敲除、超表达、酵母单/双杂交技术等也是广泛研究基因功能的途径。但是 RNAi 具有其他方法所不具备的最大优点: 由于 RNAi 是作用于 mRNA 水平, 因此在对代谢调控途径基因研究时避免了基因敲除所带来的致死性缺点。由于丙酮酸激酶是机体内一个重要的代谢调控基因, 所以本研究选择此种方式初步探讨了该基因可能对微循环产孢产生的影响。*Pyk* 基因干扰后突变菌株在产孢模式上并无明显的差异, 而产生的孢子却更具有不规则性, 由此导致菌落中孢子堆积比较紧凑, 菌落周边白色菌丝也相对较少。这一细微变化关系着微循环规则的产孢周期循环过程, 但是关于干扰该基因后导致孢子形态上差异的详细机制研究暂时还比较少。因此, 该基因在微循环产孢中的详细调控机制是今后研究工作的重点。

参考文献

- [1] Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*[J]. Microbial Mol Boil Rev, 1998,

- 62(1): 35–54.
- [2] Kolmark HG. Mutants with continuous microcycle conidiation in the filamentous fungus *Fusarium solani* f. sp. *pisii*[J]. Mol Gen Genet, 1984(198): 12–18.
- [3] Anderson JG, Smith JE. The production of conidiophores and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger* (microcycle conidiation)[J]. J Gen Microbiol, 1971(69): 185–197.
- [4] Hanlin RT. Microcycle conidiation—a review[J]. Mycoscience, 1994(35): 113–123.
- [5] Lapaire CL, Dunkle LD. Microcycle conidiation in *Cercospora zeaemaydis*[J]. Phytopathology, 2003(93): 93–199.
- [6] Maheshwari R. Microcycle conidiation and its genetic basis in *Neurospora crassa*[J]. J Gen Microbiol, 1991(137): 2103–2115.
- [7] Liu J, Cao YQ, Xia YX. Mmc, a gene involved in microcycle conidiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2010(15): 132–138.
- [8] De Faria MR, Wraight SP. Myco-insecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types[J]. Biol Control, 2007(43): 237–256.
- [9] St. Leger RJ, Wang CS. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010(85): 901–907.
- [10] Zhang SZ, Xia YZ. Identification of genes preferentially expressed during microcycle conidiation of *Metarhizium anisopliae* using suppression subtractive hybridization[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008(286): 71–77.
- [11] Inglis PW, Araga FJL, Fraza H, et al. Biolistic cotransformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000(191): 249–254.
- [12] Bernier L, Cooper RM, Charnley AK, et al. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance[J]. FEMS Microbiol Lett, 1989(60): 261–266.
- [13] Goettel MS, St. Leger RJ, Bhairi S, et al. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance[J]. Curr Genet, 1990(17): 129–132.
- [14] Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation[J]. Journal of Biological Chemistry, 1991(266): 19867–19870.
- [15] Guo XP, Xie L, Xia YX. Identification of genes that are preferentially expressed in conidiogenesis cell development of *Metarhizium anisopliae* by suppression subtractive hybridization[J]. Curr Genet, 2009(55): 263–271.
- [16] Zhang SZ, Xia YZ. Microcycle conidiation and the conidial properties in the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum* on agar medium[J]. Biocontrol Science and Technology, 2010, 20(8): 809–819.
- [17] Rae LB, Patricia TO, Richard N. The isolation, characterization, and sequence of the pyruvate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The journal of biological chemistry, 1983(25): 2193–2201.
- [18] Tuominen FW, Robert WB. Pyruvate Kinase of the spore-forming bacterium, *Bacillus licheniformis*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1971(246): 1732–1745.
- [19] Grundmann A, Kuznetsova T, Afiyatulloev SS, et al. FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin[J]. B Chembiochem, 2008(13): 2059–2063.
- [20] Clifton D, Fraenkel DG. The *gcr* (glycolysis regulation) mutation of *Saccharomyces cerevisiae*, the *gcr* (glycolysis regulation) mutation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 1981(256): 13074–13078.
- [21] Nakayashiki H. RNA silencing in fungi: mechanisms and applications[J]. FEMS Lett, 2005(257): 5950–5957.