

研究报告

过表达草菇 *Vvmapk* 对球孢白僵菌生长、抗逆和毒力的影响

陈金峰^{*1,2}, 周柚杉¹

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, 周柚杉. 过表达草菇 *Vvmapk* 对球孢白僵菌生长、抗逆和毒力的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2423-2434.

CHEN Jinfeng, ZHOU Youshan. Overexpression of *Vvmapk* affects growth, stress responses, and virulence of *Beauveria bassiana*[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2423-2434.

摘要:【背景】促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是真核生物的重要信号分子, 介导细胞增殖、分化、细胞凋亡和对外界的应激反应。【目的】研究草菇(*Volvariella volvacea*) *Vvmapk* 基因功能并进行开发应用。【方法】在 *Vvpgd* 强启动子驱动下在球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中过表达 *Vvmapk* 基因, 检测过表达菌株在生长发育、逆境胁迫和毒力方面的变化。【结果】过表达 *Vvmapk* 基因的球孢白僵菌生长速度较野生型并未改变, 但色素积累和分生孢子的产量显著增加; 在热、盐和紫外胁迫下, 分生孢子的萌发率显著升高; 对大蜡螟(*Galleria mellonella*)的杀虫能力增强, 但对腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抑菌效果却减弱。进一步研究发现: 过表达菌株中与分生孢子发育相关的 *Bbb1A*、*BbabaA* 和 *BbwetA* 基因表达上调。【结论】草菇 *VvMAPK* 正调控球孢白僵菌色素生成、分生孢子产量及对胁迫环境的抗性。本研究为草菇的基因功能研究和应用奠定了理论基础。

关键词: 球孢白僵菌; 草菇; *VvMAPK*; 抗逆性; 生长; 毒力

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); 重庆第二师范学院大学生科研项目(KY20230001)

This work was supported by the Chongqing Natural Science Foundation (CSTB2022NSCQ-MSX0261), the Key Scientific and Technological Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (KJZD-K202201601), and the College Student Research Project of Chongqing University of Education (KY20230001).

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

Received: 2023-10-15; Accepted: 2023-11-09; Published online: 2023-11-24

Overexpression of *Vvmapk* affects growth, stress responses, and virulence of *Beauveria bassiana*

CHEN Jinfeng^{*1,2}, ZHOU Youshan¹

1 School 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: [Background] Mitogen-activated protein kinase (MAPK) plays pivotal roles in cell proliferation, differentiation, apoptosis, and stress responses in eukaryotes. [Objective] To identify the roles of *Vvmapk* in *Volvariella volvacea* for applications. [Methods] *Vvmapk* was overexpressed under the control of *Vvpgd* promoter in *Beauveria bassiana*, and the roles of *Vvmapk* in the growth, development, stress responses, and virulence were examined. Compared with the wild type, the overexpression of *Vvmapk* in *B. bassiana* increased the pigment level and conidial yield but did not affect the growth. The strains overexpressing this gene displayed higher conidial germination rates under heat shock, salt, and UV-irradiation stress conditions than the control. Furthermore, *Vvmapk* overexpression endowed the fungi with stronger virulence against *Galleria mellonella* but weaker antagonistic effects against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* than the wild type. The relative transcription levels of *BbBrlA*, *BbabaA*, and *BbwetA* associated with the conidial development were significantly up-regulated in the recombinant strain. [Conclusion] VvMAPK positively regulated the conidial development, pigmentation level, and virulence of *B. bassiana*. The findings laid a theoretical foundation for the functional identification and applications of *V. volvacea* genes.

Keywords: *Beauveria bassiana*; *Volvariella volvacea*; VvMAPK; stress responses; growth; virulence

促分裂素原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)是真核生物的重要信号分子, 细胞外信号激活 MAPK 级联途径, MAPKK (mitogen-activated protein kinase)被 MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase)磷酸化后激活, 活化的 MAPKK 再磷酸化 MAPK, 磷酸化 MAPK 移入细胞核内调控基因的转录水平^[1]。MAPK 参与丝状真菌对环境的胁迫反应、生长发育和真菌与宿主之间的相互关系^[2]。同样 MAPK 信号途径调控食用真菌白玉菇 (*white Hypsizygos marmoreus*) 的发育过程^[3], LeHog1 是香菇 (*Lentinula edodes*)菌丝衰老过程中的关键因子^[4]。然而关于草菇 (*Volvariella volvacea*) MAPK 信号

分子的功能并不清楚。草菇又名南华菇和中国菇, 是我国特色的食用菌之一, 具有 300 多年的栽培历史, 我国的草菇产量居世界首位^[5]。草菇营养丰富, 味道鲜美, 富含矿物质及人体必需氨基酸、多糖等, 可以提高人体免疫力、抗氧化和减轻肥胖等^[6]。另外, 草菇还可以生物转化竹笋壳, 净化环境^[7]。随着人们对草菇需求量的逐年增加, 其潜在的商业价值巨大。然而草菇不耐储存, 低温下菌丝自溶死亡, 子实体会发生液化腐烂, 限制草菇规模化生产^[8], 探究草菇 MAPK 信号途径对草菇抗逆性功能研究具有重要的理论意义和实践价值。相较于草菇, 球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 这种防治农林害虫的虫生真菌, 具有繁殖速度快、操作

容易和遗传稳定等优点^[9], 是研究基因功能的模式生物, 可作为草菇基因功能研究的良好遗传材料。应用农杆菌介导的遗传转化方法将草菇 *Vvmapk* 基因在球孢白僵菌中过表达, 从生长发育、分生孢子对逆境的抗性和毒力等方面进行分析, 从而阐明 VvMAPK 的功能, 为草菇基因功能的挖掘和应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品

菌株和载体: 草菇 V844 栽培种购自广东揭阳锐一食用菌厂, 经子实体分化获得菌株; 尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)Bb0062、载体 pK2(bar)和农杆菌 AGL1 保存于重庆第二师范学院生物与化学工程学院微生物实验中心; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购自擎科生物技术有限公司(重庆)。大蜡螟(*Galleria mellonella*)购自天津惠裕德生物科技有限公司。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 15.0; 其中加入终浓度 50 μ g/mL 的卡那霉素进行大肠杆菌转化子筛选。YEB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 1.0, 蔗糖 5.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, 琼脂粉 15.0; 其中加入终浓度为 50 μ g/mL 卡那霉素进行农杆菌转化子筛选。查氏培养基(Czapek-Dox medium, CZA) (g/L): 蔗糖 30.0, 蛋白胨 2.5, NaNO₃ 2.0, MgSO₂·7H₂O 0.5, KCl 0.5, K₂HPO₄ 1.0, FeSO₄·7H₂O 0.1, pH 7.0。PDA 培养基(1 L): 200 g 去皮土豆切成小块, 煮沸 20 min 后过滤, 在滤液中加入 20 g 葡萄糖, 115 °C 灭菌 30 min。IM 液体培养基(g/L): 2-(N-吗啡啉)乙磺酸[2-(N-morpholine)ethanesulfonic acid, MES] 7.8, 葡萄糖 1.8, NaCl

0.3, K₂HPO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.3, 甘油 6.25, 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS) 0.038, pH 5.3。葡萄糖和 AS 需要过滤灭菌, 在培养基冷却到 55 °C 后再加入。IM 固体培养基: 相较于 IM 液体培养基, 葡萄糖减半, 琼脂粉 15.0 g/L, 其他成分同 IM 液体培养基。

裂解液: 0.3 mol/L NaOH 溶液。中和液: 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 5 mL, 0.3 mol/L HCl 20 mL, 用 ddH₂O 定容至 400 mL。30% (质量分数)草铵磷溶液用无菌水稀释 3 倍后按 0.1% 比例添加到 CZA 培养基上, 进行球孢白僵菌转化子的筛选。头孢噻肟钠溶液: 5.0 g 头孢噻肟钠溶解到 10 mL 无菌水后抽滤除菌, 按 1:400 比例添加到 CZA 培养基上抑制农杆菌生长。

1.3 主要试剂和仪器

30% (质量体积分数)草铵磷溶液购自中国农科院植保所中保绿农集团; PCR 引物合成和基因测序由华大基因科技有限公司完成; 总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒, Promega 公司; FastDigest 限制性核酸内切酶 *EcoR* I, 赛默飞世尔科技公司; DNA 纯化和质粒提取试剂盒、2×SYBR Green qPCR 混合液、2×KeyPo Master Mix (Dye Plus)、2×Taq Master Mix 和 ClonExpressII One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。PCR 仪和电转化仪, Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 耶拿分析仪器股份有限公司; 台式高速冷冻离心机, 上海力申科学仪器有限公司; Micro Drop 超微量分光光度计, 上海宝予德科学仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技股份有限公司。

1.4 草菇子实体的分化

将草菇 V844 栽培种覆土 32 °C 培养 20–30 d 长出子实体, 采摘子实体用 75% 乙醇消毒 2 min 后用无菌水洗 3 次, 每次 30 s, 然后将子实体切成 1 cm×1 cm 的小块, 置于 PDA 培养基上,

32 °C培养 7 d 获得菌丝, 作为后继试验的材料。

1.5 草菇 DNA 模板的制备

将草菇 V844 菌株接种到 PDA 培养基上 32 °C 培养 7 d, 用灭菌牙签挑取菌丝浸没于 0.3 mol/L NaOH 裂解液中, 置于 PCR 仪中 95 °C 加热 3 min 进行菌丝裂解, 然后加入 106 μL 中和液混合均匀, 混合液即为 DNA 模板。

1.6 草菇 *Vvgpd* 基因启动子的 PCR 扩增

PCR 反应体系(20 μL): 2×KeyPo Master Mix (Dye Plus)反应混合液 10 μL, *Vvgpd*-F/R 引物(表 1) (10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 8 μL。PCR 反应条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 10 s, 30 个循环; 72 °C 5 min, 获得草菇 *Vvgpd* 基因起始密码子 ATG 前 1 220 bp 片段。

1.7 草菇 *Vvmapk* 基因的 PCR 扩增

用总 RNA 提取试剂盒从草菇菌丝体中提取 RNA, 经过反转录获得 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μL): 2×KeyPo Master Mix (Dye Plus)反应混合液 10 μL, *Vvmapk*-F/R 引物(表 1) (10 μmol/L)各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应条件同 1.6,

回收 PCR 产物获得草菇 *Vvmapk* 基因 ORF 片段。

1.8 融合片段的扩增

以 *Vvgpd*-F 和 *Vvmapk*-R 为引物(表 1), 以 1.6 和 1.7 回收的片段为模板, 将草菇 *Vvgpd* 基因和 *Vvmapk* 基因 ORF 框的启动子进行 PCR 融合连接。PCR 反应体系(20 μL): 2×KeyPo Master Mix (Dye Plus)反应混合液 10 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L)各 1 μL, 回收片段各 1 μL, ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应条件同 1.6, 回收 PCR 产物获得草菇 *Vvgpd* 启动子和 *Vvmapk* 基因 ORF 融合片段。

1.9 构建重组载体

将融合片段通过同源重组的方法连接到载体 pK2(bar)上, 反应体系按照 ClonExpressII One Step Cloning Kit 说明书推荐的体系进行, 在 PCR 仪中 37 °C 保温 30 min 进行连接, 转化大肠杆菌。挑取筛选出的大肠杆菌接种到 LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 培养 16 h 后用质粒提取试剂盒提取质粒, 经过 *EcoR* I 酶切获得阳性质粒, 将质粒送华大基因科技有限公司测序确认重组载体 pK2(bar)-OE*Vvmapk* 的正确性。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in the study

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>qbrlA</i> -F	GACCAGTTCAACAGACAAG
<i>qbrlA</i> -R	CAGTAATCTTCGTGCTTCTC
<i>qabaA</i> -F	GCAAGTCTCCAGCCATAT
<i>qabaA</i> -R	CTCCTCTTCGTGCATAGTAGTC
<i>qwetA</i> -F	CGCAGACGAATTTGACTT
<i>qwetA</i> -R	GCTGGTGGTTGAATACAT
<i>Vvgpd</i> -F	CAGCTATGACCATGATTACGAATTCGGAATACTAACCCAGCAATC
<i>Vvgpd</i> -R	GCTTGAGCGTGCTCAGGCATGATGACTTAGGTGCGTAGGA
<i>Vvmapk</i> -F	TCCTACGCACCTAAGTCATCATGCCTGAGCAGCTCAAGC
<i>Vvmapk</i> -R	TCTTCTGTGACACTAGTGAATTCCTACAAGTTGATGGT
<i>qVvmapk</i> -F	GAGGAGGCATTAGCTCACCC
<i>qVvmapk</i> -R	GATGGTGGGTTGGAACGTCA
<i>PtrpC</i> -R	CATTGTTGACCTCCACTAGC
<i>actin</i> -F	GTCAAGTCATCACCATTGGC
<i>actin</i> -R	GAGGAGCAATGATCTTGACC

1.10 农杆菌转化试验

应用电击转化的方法将重组载体 pK2(bar)-OE*Vvmapk* 转入农杆菌 AGL1 中, 在 YEB 培养基中加入终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素进行筛选, 具体参考陈金峰^[9]的方法, 以 *Vvmapk*-F 和 *PtpC*-R (表 1) 为引物进行菌落 PCR 扩增验证转化的农杆菌。PCR 反应体系(10 μL): 2 \times Taq Master Mix 5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.5 μL , ddH₂O 4 μL , 用灭菌牙签挑取 AGL1 与反应体系混合。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.11 白僵菌转化试验

将农杆菌 AGL1 和球孢白僵菌的分生孢子等份混合后涂布在 IM 诱导培养基上, 利用农杆菌介导的方法将重组载体转入球孢白僵菌分生孢子中进行过表达, 具体参考 Fang 等^[10]的方法。用 1.5 方法进行菌丝裂解制备 PCR 扩增的模板, 以 *Vvmapk*-F 和 *PtpC*-R 为引物(表 1)进行 PCR 扩增筛选阳性转化子。PCR 反应体系(10 μL): 2 \times Taq Master Mix 5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.5 μL , DNA 模板 4 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。将阳性转化子转接到含有 0.1% 草铵膦溶液和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟钠的 CZA 培养基上, 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 15 d 后转接, 连续传代 3 次, 重复筛选并 PCR 验证以确定遗传的稳定性。

1.12 菌落表型试验

用 0.05% 吐温-80 悬浮球孢白僵菌菌株, 双层擦镜纸过滤除去菌丝, 获得分生孢子悬液, 调整浓度为 5×10^6 个/ mL 。取 2 μL 孢子悬液接种到 CZA 固体培养基上, 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 观察菌落形态并拍照。

1.13 单菌落产孢量的测定

将 1.12 步骤中培养 7 d 的单个菌落用锋利的

刀片连培养基一起切下来, 放入提前加入 3 mL 吐温-80 的离心管中, 剧烈振荡使分生孢子从菌株上脱落, 双层擦镜纸过滤制备分生孢子悬液, 用血球计数板计数, 分生孢子个数/ $\text{mL}=\text{N}/20\times 10^6\times$ 稀释倍数, 公式中 N 为 5 个中方格的分生孢子总数, 结果按单株菌落产生的分生孢子个数来计算产孢量。

1.14 分生孢子胁迫试验

将分生孢子悬液浓度调整为 1×10^8 个/ mL , 然后涂布在 CZA 固体培养基上。同时进行胁迫处理, 具体方法为: 在 CZA 培养基中添加 3.5% NaCl 进行盐胁迫处理; 将分生孢子悬液在 42 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中加热 30 min 进行热胁迫处理; 将涂布在 CZA 培养基上的分生孢子在功率 400 W 的超净工作台中央照射 2 min 进行紫外胁迫处理。将处理后的分生孢子于 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 15–24 h。在 15 h (未处理样品) 或 20 h (胁迫处理样品) 时用锋利的刀片切取 1 cm \times 1 cm 大小的培养基块, 用显微镜观察并拍照, 以分生孢子芽管长度超过孢子短径的 1/2 视为萌发, 统计分生孢子萌发率。萌发率(%)=萌发个数/分生孢子总数 \times 100。

1.15 实时荧光定量 PCR

将 100 μL 浓度为 1×10^8 个/ mL 的分生孢子悬液涂布在 CZA 培养基上, 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d, 用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 进行反转录获得 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应体系(10 μL): 2 \times SYBR Green qPCR 混合液 5 μL , 上、下游引物(表 1) (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.5 μL , 稀释 20 倍的 cDNA 模板 3 μL , ddH₂O 1 μL , 短暂离心混合均匀。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 39 个循环。过表达转化子中 *Vvmapk*、*Bbb1A*、*BbabaA* 和 *BbwetA* 的相对表达量均以 *actin* 的表达量为参考确定, 与野生型(wildtype, WT)的相对表达量比较来判定过表达菌株中基因的表达效果。

1.16 分生孢子侵染大蜡螟幼虫体表试验

将4龄的大蜡螟幼虫浸泡在浓度为 10^7 个/mL的分生孢子悬浮液中,浸泡10 s后立即用无菌铁丝网过滤除去滤液,将30头大蜡螟幼虫置于直径150 mm×150 mm的培养皿中,26 °C培养7 d。以球孢白僵菌野生型为对照组,检测转化子组致死大蜡螟的能力,各组均取3个生物学重复。将死亡的大蜡螟幼虫排列在新的培养皿四周,中间放入无菌水浸润的吸水纸保持湿度,观察菌丝穿出时间并拍照。

1.17 孢悬液抑菌试验

以球孢白僵菌野生型为对照,将过表达*Vvmapk*转化子接种到PDA平板上,采用浓度为 6×10^5 个/mL的分生孢子悬液对病原真菌进行抑菌试验,具体参考张胜利等^[11]的方法。

1.18 统计学分析

应用SPSS软件进行*t*检验分析: $P\leq 0.01$ 表明具有极显著差异(**); $0.01 < P \leq 0.05$ 表明具有显著差异(*); $P > 0.05$ 表明无显著差异。

2 结果与分析

2.1 重组载体的构建

重组载体构建如图1A所示,将获得的*Vvgpd*基因启动子(GenBank 登录号为KF528323.1)和*Vvmapk*基因ORF片段(GenBank 登录号为FJ906769.1)进行PCR融合连接,然后克隆到pK2(bar)载体上,经过*EcoR* I酶切,可以酶切出2 350 bp大小的片段(图1B),与预期片段大小相符;进一步测序确认克隆片段的正确性,并命名为pK2(bar)-OE*Vvmapk*。

2.2 过表达转化子的筛选

将获得的pK2(bar)-OE*Vvmapk*重组载体转入农杆菌中,以*Vvgpd*-F/*PtpC*-R为引物扩增到2 350 bp左右片段(图2A),说明重组载体转入农杆菌中。通过农杆菌介导的方法将pK2(bar)-OE*Vvmapk*重组载体转入球孢白僵菌中,以*Vvmapk*-F/*PtpC*-R为引物能扩增出1 200 bp左右的片段,说明重组载体已经转入球孢白僵菌中。

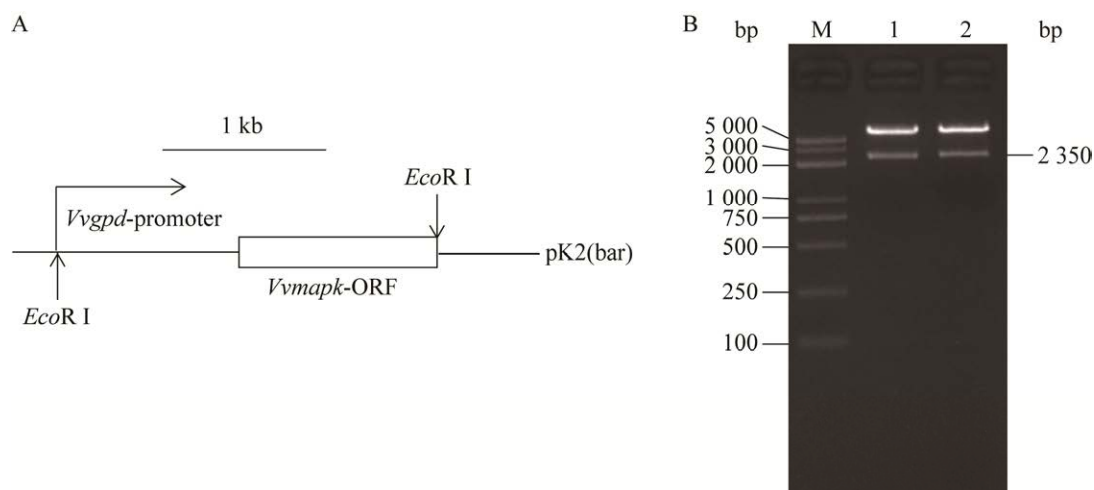


图1 重组载体 pK2(bar)-OE*Vvmapk* 的构建 A: 重组载体构建示意图. B: 重组载体的酶切验证. M: DL5000 DNA Marker; 1 和 2: 过表达的载体

Figure 1 Construction of recombinant vector pK2(bar)-OE*Vvmapk*. A: Schematic diagram of recombinant vector construction. B: Enzyme digestion validation of the recombinant vectors. M: DL5000 DNA Marker; 1 and 2: Overexpressing vectors.

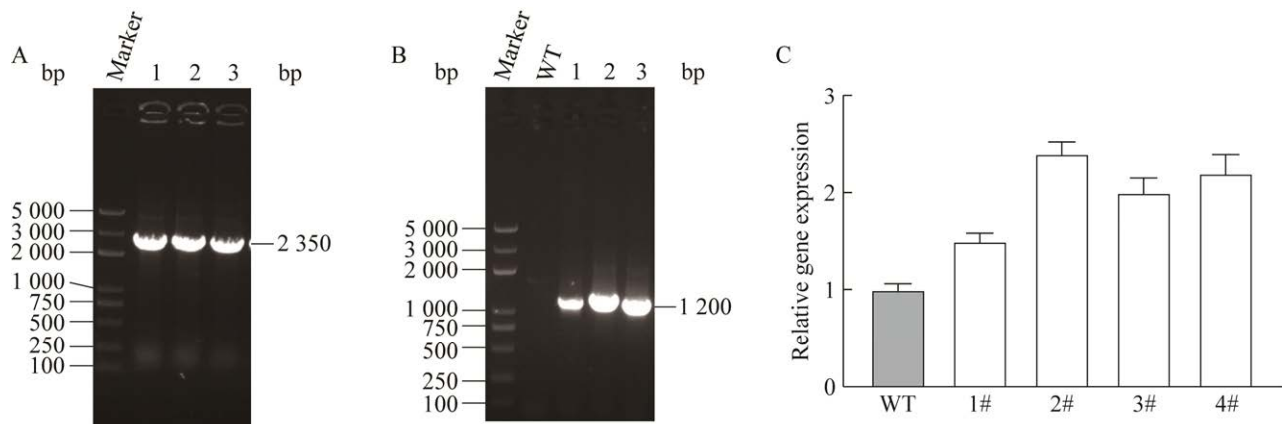


图2 过表达转化子筛选 A: 重组载体转化农杆菌的 PCR 验证. B: 重组载体转入球孢白僵菌的 PCR 验证. C: *Vvmapk* 的 mRNA 水平检测. WT: 野生型. #: 过表达菌株

Figure 2 Screening the strains overexpressing *Vvmapk* gene. A: PCR identification of the transformed *Agrobacterium*. B: Verification of the overexpressing strains of *Beauveria bassiana*. C: The relative expression levels of *Vvmapk*. WT: Wide type. #: Overexpressing strains.

(图 2B)。选取过表达的 4 个不同株系进行定量 PCR 验证。与 WT 相比, 4 个株系中 *Vvmapk* 基因相对表达量都得到不同程度的增高, 其中 2# 和 4# 株系的基因相对表达量分别是 WT 的 2.4 倍和 2.2 倍(图 2C), 因此以株系 2# 和 4# 作为后续的试验材料, 并命名为 OE*Vvmapk*-1 和 OE*Vvmapk*-2。

2.3 过表达菌株的菌落表型

将过表达菌株接种到 CZA 培养基上培养 7 d, 结果显示: 与 WT 相比, 过表达菌株的生长速度并未发生显著改变, 但次生代谢产物含量增加, 色素沉积明显, 整个菌落颜色明显加深(图 3)。

2.4 过表达菌株的产孢量和萌发率分析

将 CZA 上培养 7 d 的菌落进行产孢量分析。结果显示 WT 菌落的产孢量为 4.7×10^6 个, 显著低于 2 株过表达菌落的产孢量(均为 9.8×10^6 个, $P < 0.05$), 如图 4A 所示。分生孢子萌发试验显示: 不同菌株在 CZA 培养基上的萌发率并无显著差异($P > 0.05$), 但在盐、紫外和热胁迫条件下, 过表达菌株分生孢子的萌发率均极显著高于菌株 WT ($P < 0.01$) (图 4B)。

2.5 过表达菌株的毒力

分生孢子侵染大蜡螟幼虫体表试验结果显示: 从第 3 天起开始统计累积死亡率, 直到第 7 天为止。随着时间的延长, 大蜡螟幼虫的累积死亡率呈增加趋势。在第 4–6 天, 过表达菌株对大蜡螟幼虫累积死亡率均显著高于 WT ($P < 0.05$) (图 5A), 侵染大蜡螟幼虫的半致死时间(LT_{50})均为 3.5 d, 比 WT 的半致死时间提前

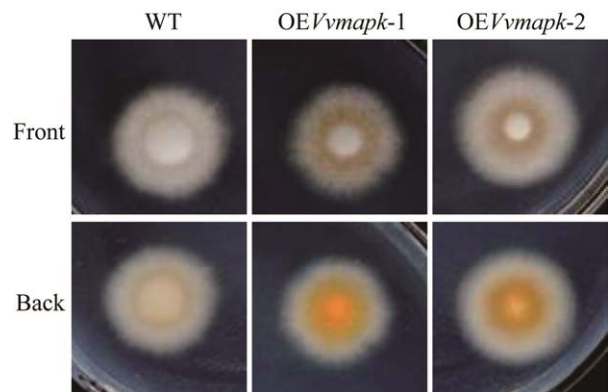


图3 过表达转化子在 CZA 培养基上生长的菌落表型

Figure 3 Growth of overexpressed strains on CZA media.

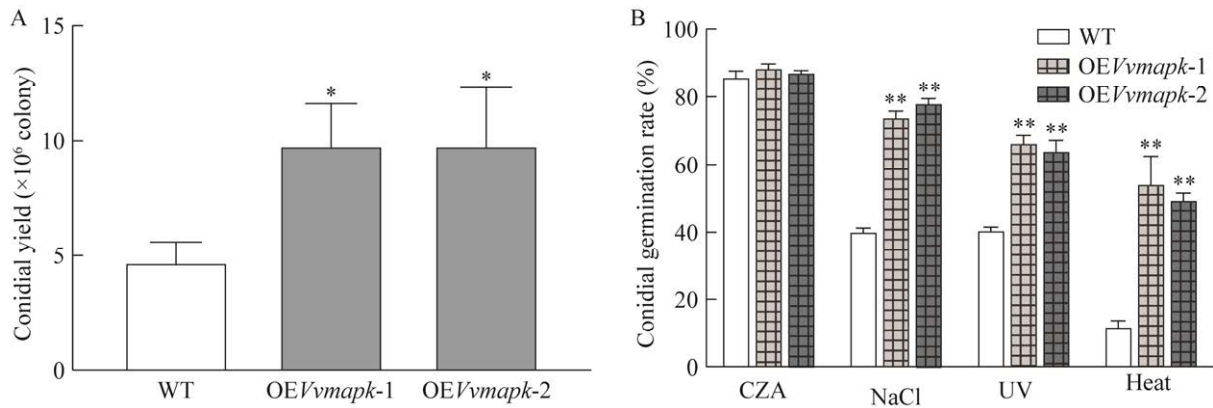


图4 过表达菌株的产孢量(A)和萌发率(B)

Figure 4 Conidial yields (A) and germination rates (B) of overexpressed strains. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. The same below.

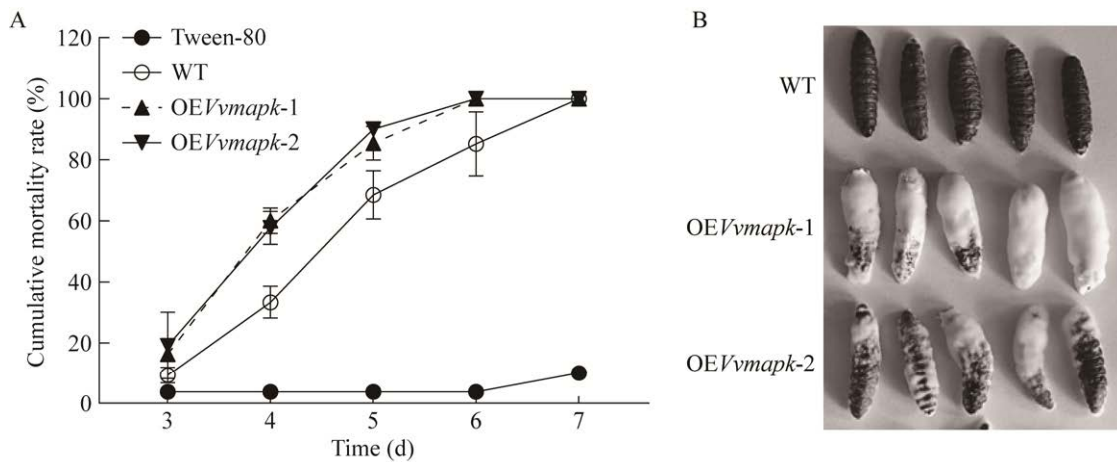


图5 过表达菌株对大蜡螟的毒力 A: 累积致死率统计. B: 菌丝穿出大蜡螟体壁的状态

Figure 5 Analysis of virulence of overexpressed strains against *Galleria mellonella*. A: Statistical analyses of the cumulative mortality. B: Penetrating ability of the strains through insect cuticle.

1 d。在侵染幼虫的第 9 天, 过表达菌株的菌丝已经穿出昆虫体壁, 虫体表大部分被菌丝包被, 而 WT 菌丝刚穿出(图 5B)。

2.6 过表达菌株对病原真菌的抑菌能力

菌株 WT 和过表达菌株对病原真菌腐皮镰刀菌和尖孢镰刀菌均具有抑制作用(图 6A、6B)。菌株 WT 对腐皮镰刀菌抑菌率最高可达 84.9%, 转化子最高可达 81.0%; 菌株 WT 对尖孢镰刀

菌的抑菌率最高达到 83.1%, 转化菌株最高达到 73.2%。在第 2 天和第 3 天, 转化子对腐皮镰刀菌的抑菌率显著低于 WT ($P < 0.05$) (图 6C); 同样, 在 15 d 内转化子对尖孢镰刀菌的抑菌率也显著低于 WT ($P < 0.05$) (图 6D)。

2.7 过表达 *Vvmapk* 基因上调分生孢子发育中心途径基因的表达

为进一步探究过表达 *Vvmapk* 对球孢白僵菌

发育影响的机制，检测过表达菌株中调控分生孢子发育关键因子的基因相对表达量。结果显示：转化株系中，调控分生孢子梗发育的基因 *BbbrlA*

的相对表达量是 WT 的 3.3 倍左右(图 7A), 调控分生孢子成熟的基因 *BbabaA* 和 *BbwetA* 的相对表达量分别是 WT 的 6.5 倍(图 7B)和 1.8 倍左右(图 7C)。

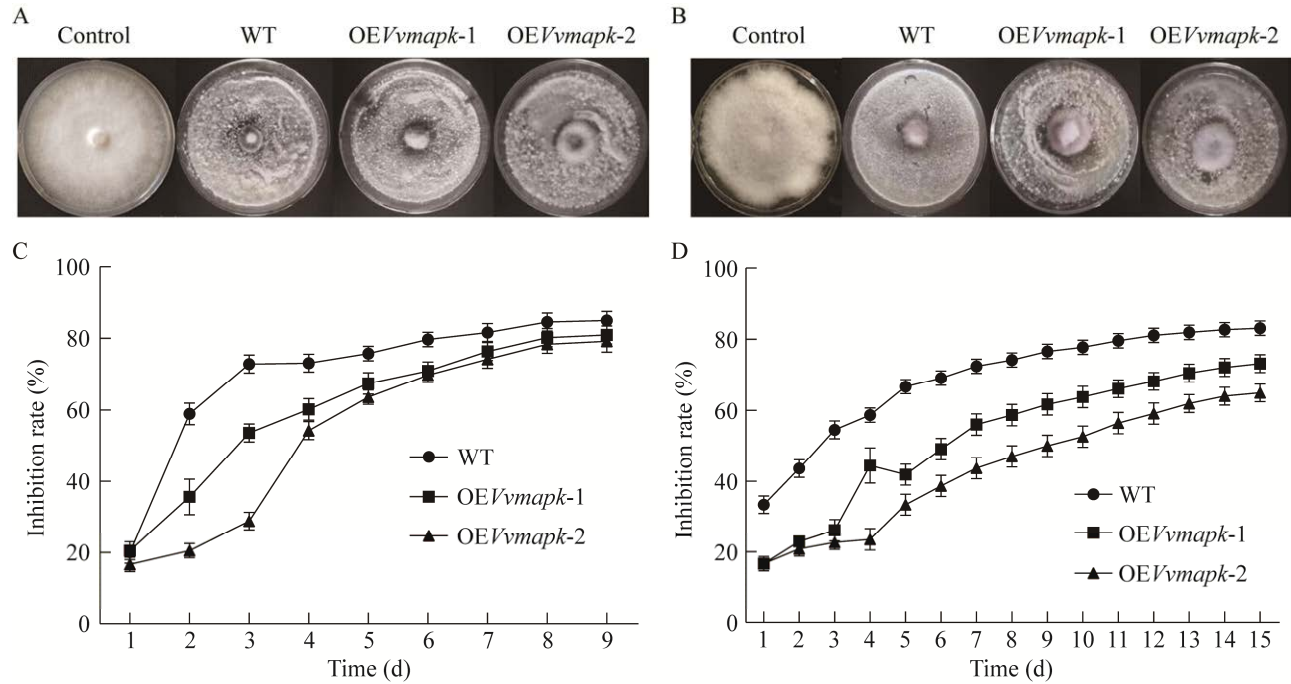


图 6 过表达菌株对病原真菌的拮抗作用 A: 对腐皮镰刀菌的抑菌能力. B: 对尖孢镰刀菌的抑菌能力. C 和 D: 对两种真菌抑菌率的统计分析

Figure 6 Antagonism of overexpressed strains against pathogenic fungi. A: Inhibition effects on *Fusarium solani*. B: Inhibition effects on *Fusarium oxysporum*. C and D: Statistical analyses of inhibition rates on two pathogens.

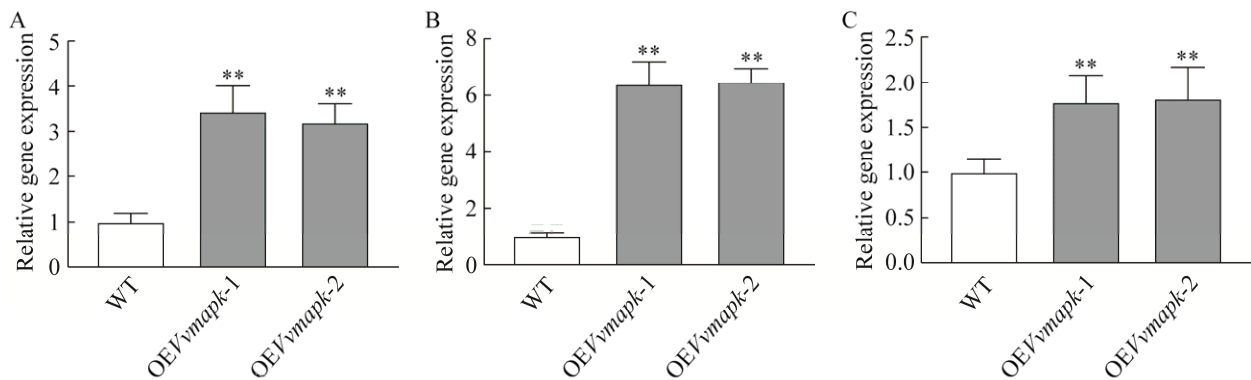


图 7 *BbbrlA* (A)、*BbabaA* (B)和 *BbwetA* (C)在过表达菌株中的表达量

Figure 7 Expression analysis of *BbbrlA* (A), *BbabaA* (B) and *BbwetA* (C) genes in overexpressed strains.

3 讨论与结论

虫生真菌 MAPK 级联途径接受外界信号, 通过 Fus/Kss1、Slr2 和 Hog1 等 3 条途径调控菌体的生长分化、细胞壁完整性和高渗胁迫反应^[12]。绿僵菌 Fus3-MAPK、Slr2-MAPK 和 Hog1-MAPK 级联途径可以调控分生孢子发育, 级联途径中相应成分被敲除后分生孢子梗受损或发育推迟, 导致分生孢子的产量减少^[13], 当 *MrHog1* 基因被敲除后, 分生孢子发育中心途径因子 *MrabaA*、*MrwetA* 和色素合成相关基因的转录水平均显著降低^[14]。球孢白僵菌中同样存在着分生孢子发育中心途径 *BrlA*-*AbaA*-*WetA*^[15]。在球孢白僵菌中过表达草菇 *Vvmapk* 基因导致菌株产孢量增加, 可能也与 *BbbrlA*、*BbabaA* 和 *BbwetA* 基因表达上调有关。

草菇 *VvMAPK* 影响球孢白僵菌抗逆性。球孢白僵菌 Hog1 途径调控高渗、高温和氧化胁迫^[16], 与 Hog1 类似的 MAPK 蛋白 *Mpk3* 协同 Hog1 响应热胁迫反应^[17]。敲除 *Bbslt2* 基因导致海藻糖合成酶基因表达下调和海藻糖含量下降, 突变株对热胁迫敏感^[18]。在烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中也发现 MAPK 途径参与多种胁迫反应^[19-20], 而白色念珠菌(*Candida albicans*) Hog1 途径在应对宿主的免疫反应中发挥重要作用^[21]。本研究证实过表达草菇 *Vvmapk* 基因的球孢白僵菌分生孢子在高盐、热胁迫和紫外胁迫下的萌发率显著增加, 分生孢子的质量得到提高, 应对环境胁迫的能力增强。这可能与 *BbwetA* 基因表达的上调有关, 因为 *BbWetA* 调控分生孢子成熟, 影响分生孢子质量和存活率^[22], 但具体的机制还需要进一步探究。

草菇 *VvMAPK* 影响球孢白僵菌毒力。Hog1

MAPK 通路不仅是渗透感应通路, 在真菌的毒力方面也起关键作用, 能够控制和致病力相关的表面黏附、形态发生或细胞壁重塑等^[23]。MAPK 信号通路还受 2C 类蛋白磷酸酶(PP2C)负调控参与丝状真菌的胁迫反应和致病能力^[24]。毒力和次生代谢产物之间存在着一定关联。球孢白僵菌侵入宿主体内汲取营养, 同时释放白僵菌素和卵孢素次生代谢产物, 最终导致宿主死亡^[25]。死亡的宿主形成僵虫, 而后菌丝穿出僵虫体壁, 开启新一轮生活史。研究结果证实过表达草菇 *Vvmapk* 基因能提高球孢白僵菌菌株色素积累, 增强对大蜡螟的致病能力, 但却减弱了对病原真菌的抑菌效果。这一结果说明 *VvMAPK* 增强球孢白僵菌毒力可能与次生代谢产物积累量升高有关, 从而加速宿主死亡, 导致菌丝提前穿出僵虫体壁。同时调控毒力和抑菌方面存在着不同的信号通路, MAPK 作为关键成分发挥着重要作用。食用真菌含有多种具有药理学活性的次生代谢产物。例如, 香菇(*Lentinula edodes*)中的聚乙炔和含硫化合物、金针菇(*Flammulina velutipes*)中的生物活性萜烯^[26]、猴头菇(*Hericium erinaceus*)中的猴头菇醇 K^[27]等。这些次生代谢产物与 MAPK 之间的关系都值得探究, 也可为草菇中次生代谢产物的挖掘和机制研究提供参考。

草菇 *VvMAPK* 能调控球孢白僵菌的产孢量、增加分生孢子抗逆性、增强对昆虫的毒力, 为草菇基因功能研究和应用提供方法。对真菌 MAPK 级联途径的磷酸化/去磷酸化调控, 以及上下游信号分子功能的研究, 形成以 MAPK 级联途径为核心的复杂信号网络, 为食用真菌 MAPK 级联信号在发育、环境胁迫和毒力等方面的功能研究提供借鉴。

REFERENCES

- [1] YUE P, ZHANG H, TONG XX, PENG T, TANG P, GAO TH, GUO JL. Genome-wide identification and expression profiling of the *MAPK*, *MAPKK*, and *MAPKKK* gene families in *Ophiocordyceps sinensis*[J]. *Gene*, 2022, 807: 145930.
- [2] MARTÍNEZ-SOTO D, RUIZ-HERRERA J. Functional analysis of the MAPK pathways in fungi[J]. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2017, 34(4): 192-202.
- [3] YANG XQ, LIN RM, XU K, GUO LZ, YU H. Comparative proteomic analysis within the developmental stages of the mushroom white *Hypsizygus marmoreus*[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(12): 1064.
- [4] GAO Q, FAN YY, WEI S, SONG S, GUO Y, WANG SX, LIU Y, YAN D. Insights into the global transcriptome response of *Lentinula edodes* mycelia during aging[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(3): 379.
- [5] 何焕清, 肖自添, 彭洋洋, 刘明, 徐江. 草菇栽培技术发展历程与创新研究进展[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(12): 53-61.
- HE HQ, XIAO ZT, PENG YY, LIU M, XU J. Development history and innovation research progress of straw mushroom cultivation technology[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, 47(12): 53-61 (in Chinese).
- [6] BAI J, LI J, PAN RR, ZHU Y, XIAO X, LI Y, LI CT. Polysaccharides from *Volvariella volvacea* inhibit fat accumulation in *C. elegans* dependent on the aak-2/nhr-49-mediated pathway[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(11): e13912.
- [7] LI HB, HE ZX, JIANG YZ, KAN J, PENG T, ZHONG MQ, HU Z. Bioconversion of bamboo shoot shells through the cultivation of the edible mushrooms *Volvariella volvacea*[J]. *Ecotoxicology*, 2021, 30(7): 1476-1486.
- [8] 赵妍, 查磊, 陈明杰, 严舒瀚, 张劲松, 马丹丹, 严培兰. 草菇 4 °C 贮藏期间的品质及生理生化研究[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(21): 7179-7186.
- ZHAO Y, ZHA L, CHEN MJ, YAN SH, ZHANG JS, MA DD, YAN PL. Morphological and physiological indexes of straw mushroom (*Volvariella volvacea*) during storage at 4 °C[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(21): 7179-7186 (in Chinese).
- [9] 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 JF. Effect of *VvLaeA* on the growth and development of *Beauveria bassiana*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(2): 685-694 (in Chinese).
- [10] FANG WG, ZHANG YJ, YANG XY, ZHENG XL, 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.
- [11] 张胜利, 李增智. 球孢白僵菌对两种植物病原镰孢的拮抗作用[J]. *中国生物防治学报*, 2011, 27(3): 349-356.
- ZHANG SL, LI ZZ. Antagonism of *Beauveria bassiana* against two *Fusarium* spp. pathogenic to cotton[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2011, 27(3): 349-356 (in Chinese).
- [12] ORTIZ-URQUIZA A, KEYHANI NO. Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi[J]. *Current Genetics*, 2015, 61(3): 239-249.
- [13] CHEN XX, XU C, QIAN Y, LIU R, ZHANG QQ, ZENG GH, ZHANG X, ZHAO H, FANG WG. MAPK cascade-mediated regulation of pathogenicity, conidiation and tolerance to abiotic stresses in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(3): 1048-1062.
- [14] ZENG GH, CHEN XX, ZHANG X, ZHANG QQ, XU C, MI WB, GUO N, ZHAO H, YOU Y, DRYBURGH FJ, BIDOCHKA MJ, ST LEGER RJ, ZHANG L, FANG WG. Genome-wide identification of pathogenicity, conidiation and colony sectorization genes in *Metarhizium robertsii*[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(10): 3896-3908.
- [15] 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.
- [16] ZHANG YJ, ZHAO JH, FANG WG, ZHANG JQ, LUO ZB, ZHANG M, FAN YH, PEI Y. Mitogen-activated protein kinase hog1 in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3787-3795.
- [17] LIU J, SUN HH, YING SH, FENG MG. The Hog1-like MAPK Mpk3 collaborates with Hog1 in response to heat shock and functions in sustaining the biological control potential of a fungal insect pathogen[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(18): 6941-6949.
- [18] LUO XD, KEYHANI NO, YU XD, HE ZJ, LUO ZB,

- PEI Y, ZHANG YJ. The MAP kinase Bbslt2 controls growth, conidiation, cell wall integrity, and virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(7): 544-555.
- [19] JI YJ, YANG F, MA DM, ZHANG JQ, WAN Z, LIU W, LI RY. HOG-MAPK signaling regulates the adaptive responses of *Aspergillus fumigatus* to thermal stress and other related stress[J]. Mycopathologia, 2012, 174(4): 273-282.
- [20] KANSHIN E, KUBINIOK P, THATTIKOTA Y, D'AMOURS D, THIBAUT P. Phosphoproteome dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* under heat shock and cold stress[J]. Molecular Systems Biology, 2015, 11(6): 813.
- [21] HERRERO de DIOS C, ROMAN E, ALONSO MONGE R, PLA J. The role of MAPK signal transduction pathways in the response to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida albicans*: implications in virulence[J]. Current Protein & Peptide Science, 2010, 11(8): 693-703.
- [22] 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.
- [23] ROMÁN E, CORREIA I, PRIETO D, ALONSO R, PLA J. The HOG MAPK pathway in *Candida albicans*: more than an osmosensing pathway[J]. International Microbiology, 2020, 23(1): 23-29.
- [24] NUNEZ-RODRIGUEZ JC, RUIZ-ROLDÁN C, LEMOS P, MEMBRIVES S, HERA C. The phosphatase Ptc6 is involved in virulence and MAPK signaling in *Fusarium oxysporum*[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(2): 206-217.
- [25] FAN YH, LIU X, KEYHANI NO, TANG GR, PEI Y, ZHANG WW, TONG S. Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(9): E1578-E1586.
- [26] FUKUSHIMA-SAKUNO E. Bioactive small secondary metabolites from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes*[J]. The Journal of Antibiotics, 2020, 73(10): 687-696.
- [27] XIE GB, TANG L, XIE Y, XIE LY. Secondary metabolites from *Hericium erinaceus* and their anti-inflammatory activities[J]. Molecules, 2022, 27(7): 2157.