

绿僵菌信息素基因(MAT1)功能研究

张二豪, 赵润东, 禄亚洲 (西藏农牧学院食品科学学院, 西藏林芝 860000)

摘要 以绿僵菌为试验材料, 通过同源重组的方法构建信息素基因(*MaMAT1*)敲除和回复载体, 利用农杆菌介导转化法获得 *MaMAT1* 基因敲除和回复菌株, 并对 Δ *MaMAT1* 菌株孢子萌发率、产孢量、抗湿热、抗紫外及毒力进行分析。结果表明, 与 WT 菌株相比, Δ *MaMAT1* 菌株的萌发率、抗湿热和抗紫外能力无显著差异, 但其产孢量、毒力显著降低。

关键词 蝗绿僵菌; 信息素; 敲除; 毒力

中图分类号 S476 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)12-0094-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.12.024



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Functional Study of *MaMAT1* in *Metarhizium acridum*

ZHANG Er-hao, ZHAO Run-dong, LU Ya-zhou (Food Science College, Tibet Agriculture and Animal Husbandry University, Linzhi, Tibet 860000)

Abstract Using *Metarhizium acridum* as the experimental material, the function of *MaMAT1*, knock-down and complementation of *MaMAT1* were constructed by homologous recombination, Δ *MaMAT1* and CP strains were obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, and the germination, sporulation, UV-B, heat shock tolerance and virulence of *MaMAT1* were analyzed. The results showed that the disruption of *MaMAT1* did not affect the germination, UV-B and heat shock tolerance, however, the sporulation and virulence significantly decreased compared to WT.

Key words *Metarhizium acridum*; MAT1; Knock-down; Virulence

昆虫病原真菌作为一类潜在生防微生物, 在害虫防治过程中扮演着重要角色。截至 2017 年, 已有 200 多种昆虫病原真菌被注册并用于害虫防治^[1]。蝗绿僵菌(*Metarhizium acridum*)作为一种重要的昆虫病原真菌, 在亚洲、非洲和澳洲已被广泛用于蝗虫和蚱蜢的防治^[2-4]。蝗绿僵菌作为昆虫病原真菌的模式生物, 其侵染致病过程具有明显的特征, 即孢子萌发、菌丝发育、附着孢分化、浸染钉的形成及昆虫体内定殖^[5-7]。但其较高的生产成本、较长的致死时间限制其大规模应用, 因此提高昆虫病原真菌产孢量, 增强毒力、缩短发酵时间成为人们研究的热点。

“信息素(荷尔蒙)”在真核生物中是远距离作用的化学物质。普遍认为“信息素”是性别因子, 控制性别和形态形成^[8]。真菌中, 雌性或雄性菌丝产生甾醇类信息刺激雌性或雌性器官的产生^[9]。在植物病原真菌 *Phytophthora* 和 *Pythium* 上, 甾醇类信息调节有性生殖和无性生殖。如在 *Pythium sylvaticum* 上可扩散的信息分别控制异宗配合或非自我兼容的交配器官的形成^[10]。信息诱导是玉米黑粉病菌(*Ustilago maydis*)侵染的必需阶段^[11], 信息首先诱导交配型菌丝结合, 然后在 tubulin 基因的作用下形成具有侵染性的双核菌丝, 诱导细胞核的形成^[12-13]。在昆虫病原真菌 *Lagenidium giganteum* 中有相类似的信息行为。在 *Allomyces species* 中, 雌性和雄性孢子形成丝状结合体参与有性生殖。在 *Zygomycota* 中, 大多数菌丝是异宗配合的, 它们通过同宗配合和异宗配合实现有性生殖, 在这一过程中信息调控了菌丝从无性到有性的转换^[14-15]。在子囊菌的 *Neurospora crassa* 上也观察

到了性信息的作用痕迹, 但没有分离出相应的化合物^[16-17]。在担子菌中, 脂肽类信息参与双核的形成和子实体的发育^[18]。研究者普遍意识到真菌的内源性信息和动物类信息具有同源性^[9, 19]。它们在真菌的生长和发育过程中扮演着重要角色^[20]。

蝗绿僵菌不同产孢时期转录组分析发现信息素基因显著上调表达, 而信息素(*MAT*)基因在绿僵菌的产孢、抗性、侵染、定殖和致病力方面的功能尚不清楚。因此探索信息基因在蝗绿僵菌产孢、抗性、侵染、定殖和致病力方面的功能, 为提高蝗绿僵菌孢子生产和害虫防治提供理论依据和技术途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试蝗绿僵菌 CQMa102(*Metarhizium acridum*102)菌株分离于被感染的竹脊飞蝗僵虫尸体上。大肠杆菌(*Escherichia coli*)和根癌农杆菌感受态(*Agrobacterium tumefaciens*)均由西藏农牧学院生物技术实验室制备。毒力生测中所用的东亚飞蝗由西藏农牧学院生物技术实验室提供, 其饲养条件: 光照周期 16 h:8 h(光:暗), 温度为(28±2)℃, 相对湿度 70%^[21]。

1.2 试验方法

1.2.1 蝗绿僵菌 *MaMAT1* 基因的敲除。提取蝗绿僵菌基因组 DNA, 分别扩增 *MaMAT1* 基因上游(左臂)和下游(右臂)序列, 根据同源重组的原理将左右臂序列分别连接到 pK2-PB 敲除载体上, 将构建好的载体转化至大肠杆菌感受态细胞中, 并涂布于 LB 固体培养基上(含 50 μg/mL 的卡那霉素), 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 12 h, 挑取单菌落并 PCR 验证, 将构建好的 pK2-PB-*MaMAT1*-L/R 敲除载体转化至根癌农杆菌感受态细胞^[22], 与绿僵菌共培养以获得 *MaMAT1* 基因敲除菌株。

1.2.2 蝗绿僵菌孢子萌发率的测定。取在 1/4 SDA 培养基

基金项目 西藏自治区科学技术厅科学研究一般项目(XZ2018ZRG-19)。

作者简介 张二豪(1989—), 男, 河南鲁山人, 实验师, 硕士, 从事分子生物学研究。

收稿日期 2020-09-29; **修回日期** 2020-10-19

上培养 14 d 的新鲜成熟孢子,将 100 μL 1×10^7 个/mL 的孢子悬液均匀涂布于 1/4 SDA 平板上,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 12 h,期间每 3 h 观察一次,当孢子出芽长度等于或大于孢子直径 50% 时视为萌发,每组 3 次重复。计算公式:萌发率 = 萌发孢子总数/总孢子数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 蝗绿僵菌产孢量的测定。取在 1/4 SDA 培养基上培养 14 d 的新鲜成熟孢子,并配制 1×10^7 个/mL 的孢子悬液,取 5 μL 孢子悬液于含有 1/4 SDA 培养基的 24 孔板中,28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养,每隔 3 d 观察一次,并在显微镜下统计孢子数,每组 3 次重复。产孢量 = 孢子数/孔面积。

1.2.4 蝗绿僵菌孢子抗湿热、抗紫外能力测定^[21]。

(1) 抗湿热能力测定。取培养 14 d 的新鲜成熟蝗绿僵菌孢子,取 50 μL 经 45 $^{\circ}\text{C}$ 处理 0、2、4、6、8 h 浓度为 1×10^7 个/mL 的孢子悬液均匀涂布于 1/4 SDA 固体培养基上,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 20 h,显微镜下统计萌发孢子数,每组设 3 次重复。计算公式同“1.2.2”。

(2) 抗紫外能力测定。取培养 14 d 的新鲜成熟蝗绿僵菌孢子,取 100 μL 浓度为 1×10^7 个/mL 的孢子悬液均匀涂布于 1/4 SDA 固体培养基上,在 1 350 mW/m^2 紫外条件下,28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养,每 2 h 观察一次,连续观察 8 h,显微镜下统计孢子萌发率。每组设 3 个重复。计算公式同“1.2.2”。

1.2.5 蝗绿僵菌毒力测定^[21]。

(1) 体表侵染。配制 1×10^7 个/mL 的石蜡油孢子悬液,取 5 μL 孢子悬液点滴于 5 龄东亚飞蝗幼虫的背板上,每组 40 头,每 12 h 统计一次,直至蝗虫全部死亡,蝗虫死亡率 = 死亡数/总头数 $\times 100\%$ 。以点滴不含孢子的石蜡油试验组为阴性对照。每组设 3 个重复。

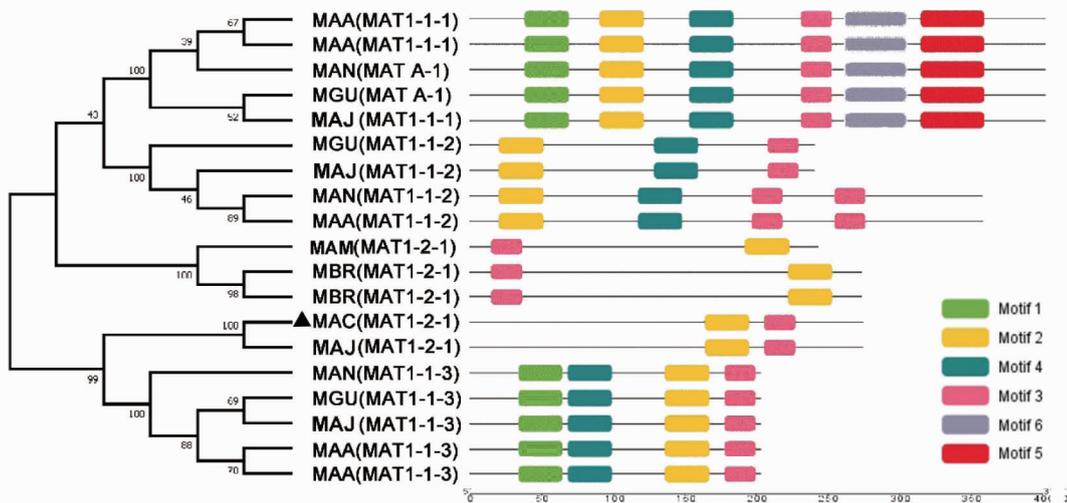
(2) 体内注射。配制 1×10^6 个/mL 的孢子水悬液,于 5 龄东亚飞蝗幼虫腹部第二、三腹节处注射 5 μL 孢子悬液,每组 40 头,每 12 h 统计一次,直至蝗虫全部死亡,蝗虫死亡率 = 死亡数/总头数 $\times 100\%$ 。以注射 5 μL ddH₂O 的试验组为阴性对照组。每组设 3 个重复。

1.3 数据分析 用 Excel 2019 对试验数据进行处理,Graph-Pad.Prism5.02 软件作图,用 SPSS 20.0 进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 MaMAT1 基因生物信息学分析 生物信息学分析表明, *MaMAT1* cDNA ORF 全长为 741 bp,编码 246 个氨基酸。在线预测分析发现 *MaMAT1* 蛋白分子量 (M_w) 为 28.1 kD,等电点 (pI) 是 9.51。通过 NCBI 数据库找出其他 7 种绿僵菌 *MAT1* 蛋白序列,通过同源比对及系统发育树分析表明,蝗绿僵菌 *MaMAT1* 基因位点仅含有 *MAT1-2-1* 基因,且与大孢绿僵菌 (*Metarhizium majus*, MAJ) *MAT1-2-1* 基因聚为一支,其相似性高达 94.72% (图 1)。

2.2 MaMAT1 基因敲除和回复验证 根据同源重组原理,利用根瘤农杆菌介导转化法获得 $\Delta MaMAT1$ 和 CP 菌株,其载体构建原理见图 2A。提取 WT、 $\Delta MaMAT1$ 和 CP 菌株基因组 DNA,用 *BfrBI* 和 *Nsp7121I* 限制性内切酶进行酶切并 Southern blot 验证 (图 2B),结果表明,WT 和 $\Delta MaMAT1$ 菌株仅有一条条带,其大小分别为 500 和 1 000 bp,而 CP 菌株含有 2 条条带 (500 和 1 000 bp),其大小分别与 WT 和 CP 菌株一致。综上所述,该试验所获得的 $\Delta MaMAT1$ 和 CP 菌株均为阳性转化子。



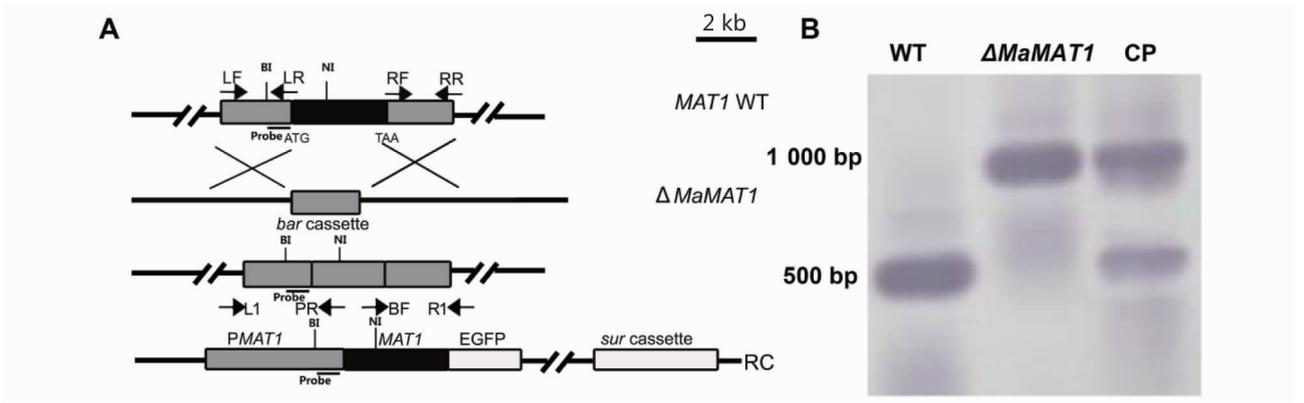
Note: *Metarhizium album* (MAM); *Metarhizium acridum* (MAC); *Metarhizium majus* (MAJ); *Metarhizium guizhouense* (MGU); *Metarhizium brunneum* (MBR); *Metarhizium anisopliae* (MAN); *Metarhizium robertsii* (MAA)

图 1 7 种绿僵菌信息素基因的同源性和结构域分析

Fig 1 Conserved domain and phylogenetic analysis of *MaMAT1* from seven different *Metarhizium*

2.3 MaMAT1 基因对蝗绿僵菌孢子萌发率和产孢量的影响 为分析 *MaMAT1* 基因缺失对蝗绿僵菌孢子萌发率和产孢量的影响,分别对 $\Delta MaMAT1$ 、WT 和回复 (CP) 菌株的萌发率和产孢量进行研究。结果表明, *MaMAT1* 基因缺失不影响

孢子萌发率,与 WT 和 CP 菌株相比,差异不显著 (图 3A),但其产孢量显著低于 WT 和 CP 菌株 (图 3B)。综上所述, *MaMAT1* 基因不影响蝗绿僵菌孢子萌发率,但显著影响其产孢量。

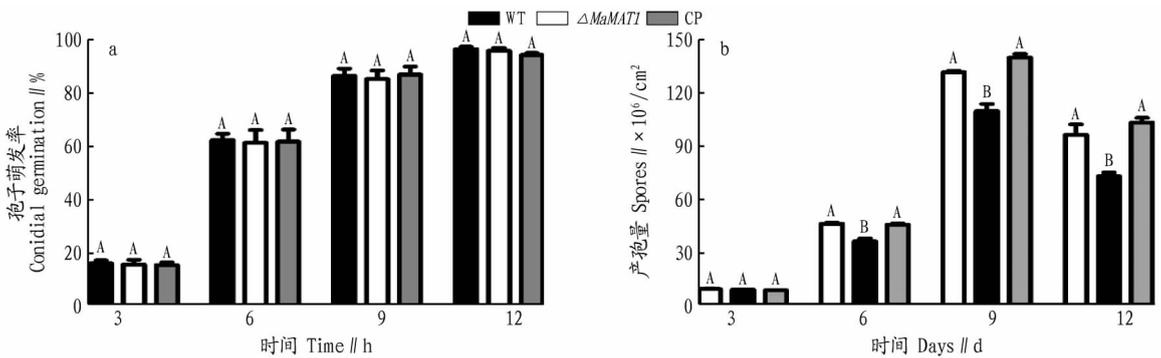


注:A.*MaMAT1* 基因敲除和回复载体构建模式;B.Southern blot 验证

注:A.The construction pattern of *MaMAT1* disruption and complemented vector;B.Southern blot

图 2 *MaMAT1* 基因敲除和回复验证

Fig.2 Construction and verification of *MaMAT1* knockdown and complemented strains



注:不同大写字母表示不同菌株间差异显著($P < 0.01$)

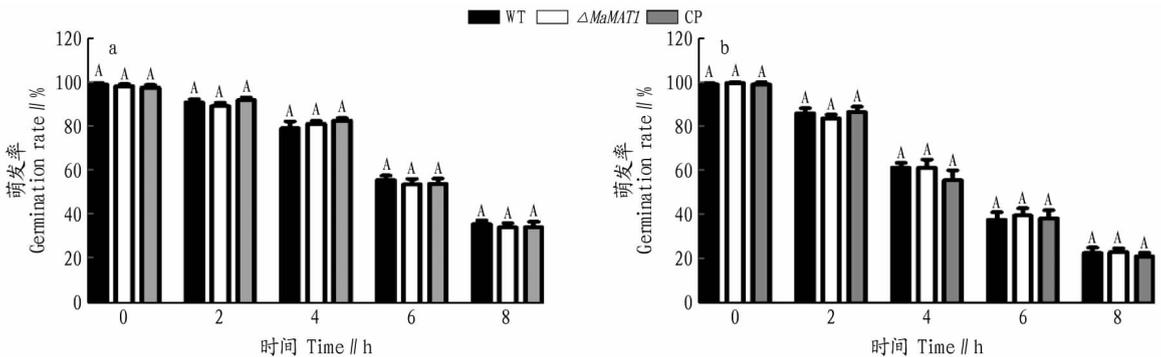
Note: Different capital letters indicated significant difference between different strains at 0.01 level

图 3 *MaMat1* 基因对蝗绿僵菌孢子萌发率和产孢量的影响

Fig.3 Effects of *MaMat1* on conidial germination and sporulation

2.4 *MaMAT1* 基因对蝗绿僵菌孢子抗湿热和抗紫外能力的影响 为分析 *MaMAT1* 对蝗绿僵菌孢子抗湿热和抗紫外能力的影响,分别对 $\Delta MaMAT1$ 、WT 和 CP 菌株的抗湿热和抗紫外

能力进行了研究。结果表明,与 WT 和 CP 菌株相比, $\Delta MaMAT1$ 菌株抗湿热和抗紫外能力无显著差异(图 4)。综上所述,*MaMAT1* 基因的缺失不影响蝗绿僵菌的抗逆境能力。



注:不同大写字母表示不同菌株间差异显著($P < 0.01$)

Note: Different capital letters indicated significant difference between different strains at 0.01 level

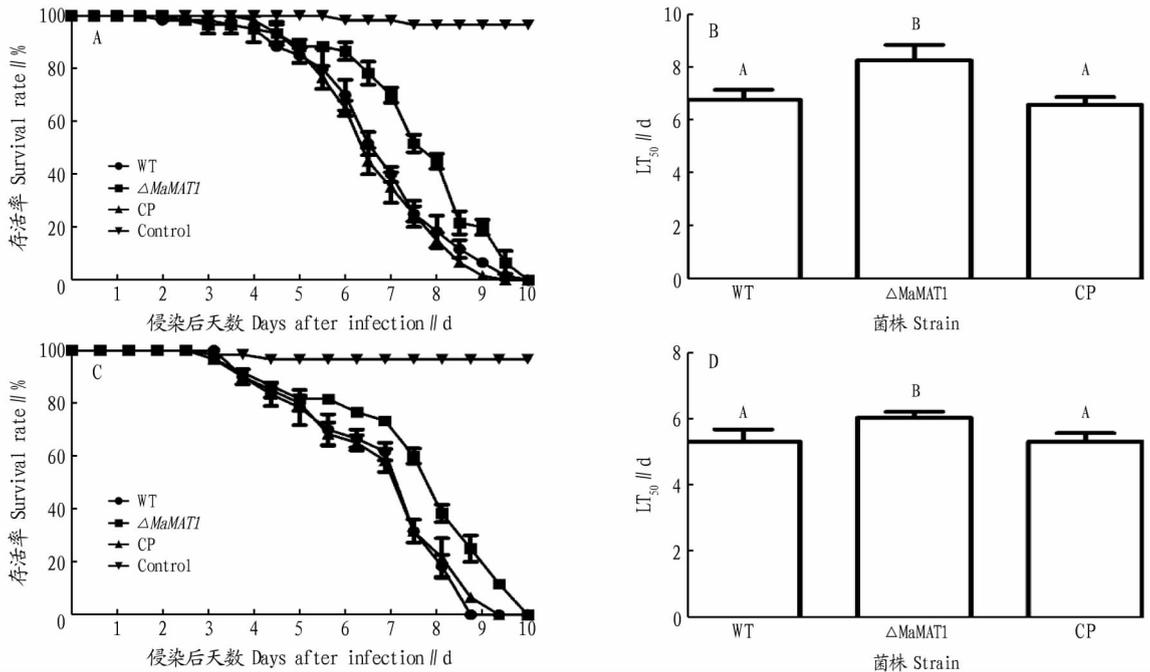
图 4 *MaMat1* 基因对蝗绿僵菌抗湿热和抗紫外能力的影响

Fig.4 Effects of *MaMat1* on UV-B and heat shock tolerance

2.5 *MaMAT1* 基因对毒力的影响 以东亚飞蝗 5 龄幼虫为试验材料,采用体内注射和体表接种 2 种方法研究 *MaMAT1* 基因缺失对蝗绿僵菌孢子毒力的影响。点滴试验结果表明, $\Delta MaMAT1$ 菌株毒力显著低于 WT 和 CP ($P < 0.05$),与 WT 相

比,其半致死时间推迟了 1.49 d(图 5A、B)。注射试验结果表明, $\Delta MaMAT1$ 菌株的毒力降低,差异显著($P < 0.05$),与 WT 相比,其半致死时间推迟了 0.72 d(图 5C、D)。综上所述, *MaMAT1* 基因影响绿僵菌对体表的穿透能力和在蝗虫体内

免疫应答。



注:不同大写字母表示不同菌株间差异显著 ($P < 0.01$)

Note: Different capital letters indicated significant difference between different strains at 0.01 level

图5 *MaMAT1* 基因缺失对毒力的影响

Fig.5 Effects of *MaMAT1* on the virulence of *M.acridum*

3 讨论

信息素在真核生物中作为一类调节类物质,在其生长发育过程中扮演着重要角色^[20]。MAT1-1 和 MAT1-2 是控制真菌交配的关键基因,即使亲缘关系较近的物种,其 MAT1-1 和 MAT1-2 位点所含的基因数量也不同,如罗伯茨绿僵菌、球孢白僵菌和蛹虫草^[23]。生物信息学分析表明蝗绿僵菌中仅含有信息素基因 MAT1-2。

研究表明,在担子菌中,信息类物质参与双核的形成和子实体的发育^[18]。该试验研究表明,*MaMAT1* 基因不影响蝗绿僵菌孢子萌发率,但其产孢量显著降低,可能是由于 *MaMAT1* 基因的缺失影响了绿僵菌孢子的发育过程。抗逆境试验分析表明,*MaMAT1* 基因的缺失不影响绿僵菌抗湿热和抗紫外能力,说明 *MaMAT1* 基因的缺失基本不影响绿僵菌细胞壁的结构和厚度。真菌中的信息素类似于植物中的生长调节因子(生长素、赤霉素、脱落酸和乙烯),在植物病原菌赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*)中,其产生赤霉素参与宿主的致病过程。白色念珠菌中信息受体系统参与了宿主的附着作用^[24]。蝗绿僵菌 MAT1 基因的缺失导致其毒力显著降低,这与前人研究结果一致,说明 MAT1 基因可能参与了宿主附着作用和致病过程。

蝗绿僵菌作为一种重要昆虫病原真菌,在害虫防治方面扮演着重要角色,其产孢量和毒力是限制其大规模应用的关键因素。从该试验结果可知,*MaMAT1* 基因参与蝗绿僵菌产孢和毒力有关。这一研究结果为提高孢子产量和毒力提供理论依据。

参考文献

- [1] KUMAR K K, SRIDHAR J, MURALI-BASKARAN R K, et al. Microbial biopesticides for insect pest management in India: Current status and future prospects [J]. *J Invertebr Pathol*, 2019, 165: 74-81.
- [2] LOMER C J, BATEMAN R P, JOHNSON D L, et al. Biological control of locusts and grasshoppers [J]. *Annu Rev Entomol*, 2001, 46: 667-702.
- [3] HUNTER D M, MILNER R J, SPURGIN P A. Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) [J]. *Bull Entomol Res*, 2001, 91(2): 93-99.
- [4] PENG G X, WANG Z K, YIN Y P, et al. Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China [J]. *Crop Prot*, 2008, 27(9): 1244-1250.
- [5] ST LEGER R J. *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interactions [M] // VURRO M, GRESSSEL J. Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management. Dordrecht: Springer Verlag, 2007: 179-204.
- [6] GAO Q, JIN K, YING S H, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum* [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(1): 1-18.
- [7] ST LEGER R J S, WANG C S. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(4): 901-907.
- [8] DYER P S. Evolutionary biology: Genomic clues to original sex in fungi [J]. *Curr Biol*, 2008, 18(5): R207-R209.
- [9] GOODAY G W, ADAMS D J. Sex hormones and fungi [J]. *Adv Microb Physiol*, 1993, 34: 69-145.
- [10] GALL A M, ELLIOTT C G. Control of sexual reproduction in *Pythium sylvaticum* [J]. *Trans Br Mycol Soc*, 1985, 84(4): 629-636.
- [11] FELDBRÜGGE M, KÄMPER J, STEINBERG G, et al. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis* [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7(6): 666-672.
- [12] FUCHS U, MANN S I, STEINBERG G. Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis* [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(6): 2746-2758.

(下转第 102 页)

ana)、猕猴桃科的猕猴桃(*Actinidia deliciosa*)、梧桐科的可可(*Theobroma cacao*)、茄科的番茄(*Solanum lycopersicum*)、毛茛科的牡丹(*Paeonia suffruticosa*)、大戟科的橡胶(*Hevea brasiliensis*)和戟科的木薯(*Manihot esculenta*)已登录 2 个 *GID1* 基因。同样单子叶植物中,薯蓣科的山药(*Dioscorea polystachya*)、禾本科的玉米(*Zea mays*)、普通小麦(*Triticum aestivum*)和芭蕉科的小果野蕉(*Musa acuminata*)等植物也登录了 2 个 *GID1* 基因。猕猴桃、可可、玉米等 2 个基因为旁系枝自展值达 90% 以上,其他植物的基因非旁系枝,发现植物的基因之间不仅存在物种差异,还存在基因类型差异,比如猕猴桃的 *GID1a* 和 *GID1b* 之间基因同源性达到 67%,山药的 *GID1a* 和 *GID1b* 之间基因同源性达到 45%。双子叶植物和单子叶植物的 *GID1* 基因数量表明,植物中含有 2 个以上 *GID1* 基因,Gazara 等^[8]研究发现,每个取样组织中至少有 1 个基因在表达,除了以上 11 种植物的 *GID1* 基因已克隆并登录 2 个基因,其他植物的 *GID1* 基因有待进一步克隆分析。从 98 个 *GID1* 基因聚类分析可知,*GID1* 基因的起源尚不明确,在植物基因组中可能出现多次复制,导致基因组的分枝发散。91 种植物的 98 个 *GID1* 基因具有相同的保守区域。Guan 等^[17]研究了 *GID1* 基因的同源性,发现可依赖基因之间的保守性来克隆未知基因。

4 结论

更多植物未知的 *GID1* 基因有待克隆。系统发育树中 *GID1* 拥有共同的根系,单子叶植物纲中没有分类现象,而双子叶植物纲中有分类现象,说明基因组中出现复制进化。所有已知的 *GID1* 基因序列具有相同的保守区域。

参考文献

- [1] OLSZEWSKI N, SUN T P, GUBLER F. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(S1): S61-S80.
- [2] 李巧映, 张丽, 王玉, 等. 赤霉素调控植物开花及花器官发育的研究进展

- [J]. *中国细胞生物学报*, 2019, 41(4): 746-758.
- [3] 陈敏. 紫花苜蓿赤霉素受体基因 *MsGID1b* 的克隆及功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [4] 黄桃鹏, 李媚娟, 王睿, 等. 赤霉素生物合成及信号转导途径研究进展[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(8): 1241-1247.
- [5] YOSHIDA H, TANIMOTO E, HIRAI T, et al. Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor *GID1*[J]. *PNAS*, 2018, 115(33): E7844-E7853.
- [6] GE W J, STEBER C M. Positive and negative regulation of seed germination by the Arabidopsis GA hormone receptors, *GID1a*, *b*, and *c*[J]. *Plant Direct*, 2018, 2(9): 1-11.
- [7] UEGUCHI-TANAKA M, ASHIKARI M, NAKAJIMA M, et al. Gibberellin Insensitive Dwarf 1 encodes a soluble receptor for gibberellin[J]. *Nature*, 2005, 437(7059): 693-698.
- [8] GAZARA R K, MOHARANA K C, BELLIENY-RABELO D, et al. Expansion and diversification of the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (*GID1*) family in land plants[J]. *Plant Mol Biol*, 2018, 97(4/5): 435-449.
- [9] THOMAS S G, RIEU I, STEBER C M. Gibberellin metabolism and signaling[J]. *Vitamins & Hormones*, 2005, 72: 289-338.
- [10] AYA K, UEGUCHI-TANAKA M, KONDO M, et al. Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of *GAMYB*[J]. *The plant cell*, 2009, 21(5): 1453-1472.
- [11] NAKAJIMA M, SHIMADA A, TAKASHI Y, et al. Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors[J]. *Plant J*, 2006, 46(5): 880-889.
- [12] ALEMAN L, KITAMURA J, ABDEL-MAGEED H, et al. Functional analysis of cotton orthologs of GA signal transduction factors *GID1* and *SLR1*[J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 68(1/2): 1-16.
- [13] CHANDLER P M, HARDING C A, ASHTON A R, et al. Characterization of gibberellin receptor mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Mol Plant*, 2008, 1(2): 285-294.
- [14] 张亚平. 裸子植物在城市园林绿化中的应用[J]. *现代园艺*, 2017(16): 127-128.
- [15] 李琦, 籍霞, 王恩辉, 等. 苔藓植物对青岛市大气重金属污染的生物监测作用[J]. *植物学报*, 2014, 49(5): 569-577.
- [16] 闫德仁, 张胜男, 黄海广, 等. 沙漠苔藓植物分解的土壤改良效应[J]. *水土保持研究*, 2020, 27(3): 225-229, 237.
- [17] GUAN Y R, XUE J Q, XUE Y Q, et al. Effect of exogenous GA₃ on flowering quality, endogenous hormones, and hormone-and flowering-associated gene expression in forcing-cultured tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. *J Integr Agric*, 2019, 18(6): 1295-1311.

(上接第 97 页)

- [13] ZHANG J, JIN K, XIA Y X. Contributions of β -tubulin to cellular morphology, sporulation and virulence in the insect-fungal pathogen, *Metarhizium acridum*[J]. *Fungal Genet Biol*, 2017, 103: 16-24.
- [14] VAN DEN E H. Sexual interactions in the lower filamentous fungi[M]// LINSKENS H F, HESLOP-HARRISON J. Cellular interactions. Berlin: Springer-Verlag, 1984.
- [15] VAN DEN ENDE H. Sexual factor of the Mucorales [J]. *Nature*, 1967, 215(5097): 211-212.
- [16] BISTIS G N. Chemotropic interactions between trichogynes and conidia of opposite mating-type in *Neurospora crassa*[J]. *Mycologia*, 1981, 73(5): 959-975.
- [17] BISTIS G N. Evidence for diffusible, mating-type-specific trichogyne attractants in *Neurospora crassa*[J]. *Exp Mycol*, 1983, 7(3): 292-295.
- [18] DYER P S, INGRAM D S, JOHNSTONE K. The control of sexual morpho-

- genesis in the ascomycotina[J]. *Biol Rev*, 1992, 67(4): 421-458.
- [19] LENARD J. Mammalian hormones in microbial cells [J]. *Trends Biochem Sci*, 1992, 17(4): 147-150.
- [20] KOLE H K, SMITH D R, LENARD J. Characterization and partial purification of an insulinase from *Neurospora crassa* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 297(2): 199-204.
- [21] 张二豪. 绿僵菌乙醇脱氢酶 1 基因功能及其启动子结构与功能研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
- [22] BUNDOCK P, MRÓCZEK K, WINKLER A A, et al. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*[J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(1): 115-121.
- [23] ZHENG P, XIA Y L, ZHANG S W, et al. Genetics of *Cordyceps* and related fungi[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(7): 2797-2804.
- [24] KRAVITSOV E G, ANOKHINA I V, RYBAS Y A, et al. Effects of female sex hormones on adhesion of *Candida albicans* yeast-like fungi to the buccal epithelium [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2014, 157(2): 246-248.