



## 黄曲霉分生孢子色素合成基因 *pks1* 的鉴定及其对生长发育和侵染性的影响

魏鹏霖<sup>1,2</sup>, 张鹏<sup>2</sup>, 李伟<sup>2\*</sup>, 汪世华<sup>1\*</sup>, 尹文兵<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 福建农林大学生命科学学院, 福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室, 福建 福州 350002

<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101

**摘要:**【目的】分生孢子色素是真菌细胞壁的重要成分, 对真菌的生长发育极为重要, 并有助于真菌抵御各种环境胁迫。本研究鉴定了黄曲霉分生孢子色素合成基因, 并研究了分生孢子色素对黄曲霉生长发育及其对抗紫外照射和侵染能力的影响。【方法】通过已知真菌孢子色素合成基因蛋白序列同源比对确定了黄曲霉分生孢子色素合成基因及其所在的基因簇, 利用同源重组策略对目标基因进行敲除, 获得了该色素合成基因缺失的突变菌株, 并研究该基因敲除后对表型、产孢、菌核形成、黄曲霉毒素产生、抗紫外照射和侵染性等影响。【结果】与野生型菌株相比, 黄曲霉 *pks1* 基因缺失菌株的分生孢子颜色变为白色, 生长速度、孢子产量、菌核形成和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的产生均没有显著性变化, 但该基因的缺失导致孢子对紫外线照射的抵御能力明显减弱, 降低了黄曲霉对玉米和花生种子的侵染能力。【结论】*pks1*(AFLA\_006170)基因是黄曲霉分生孢子色素合成的关键基因, 影响黄曲霉分生孢子对紫外线照射等不利环境因子的抵抗能力和对粮食种子的侵染能力。

**关键词:** 黄曲霉, 分生孢子色素, 生长发育, 抗紫外性, 侵染性

真菌孢子色素是真菌产生的一类重要的次级代谢产物, 在真菌生长发育过程中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。例如, 类胡萝卜素(carotenoids)色素可起到抗氧化应激和对可见光或紫外线照射的保护作用<sup>[2]</sup>; 色素 asparasone 对于黄曲霉(*Aspergillus flavus*)的菌核存活非常重要<sup>[3]</sup>; 黑色素(melanin)对人类条件致病菌烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)分

生孢子的完整性非常重要<sup>[4]</sup>, 也是烟曲霉致病过程中关键的毒力因子, 通过阻碍宿主对 LC3 相关的吞噬来发挥作用<sup>[5-6]</sup>; 土曲霉(*Aspergillus terreus*)中的特征色素 aspmelanin 可以抵抗紫外线照射并能阻断土壤变形虫的吞噬作用<sup>[7]</sup>; 植物内生菌无花果拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis fici*)的多细胞孢子中黑色素是分生孢子发育和保护分生孢子抵御各种

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0400105)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-10-64806170; E-mail: 李伟, liw@im.ac.cn, 汪世华, wshyy1@sina.com

收稿日期: 2018-11-15; 修回日期: 2019-01-23; 网络出版日期: 2019-03-13

环境胁迫所必不可少的成分<sup>[8]</sup>。真菌分生孢子色素合成机制的阐明对于理解这些次级代谢物影响真菌生长发育及其对抵御环境胁迫和致病的机理具有重要的意义。

黄曲霉是一种重要的腐生土壤真菌，是导致玉米和花生等粮食农作物和食物霉变的重要因素，黄曲霉产生的黄曲霉毒素(aflatoxin)会导致人类和动物中毒或诱发肝癌<sup>[9-10]</sup>。黄曲霉也是重要的动物和人类条件致病菌，通过侵入性生长导致免疫功能低下人群曲霉菌病(aspergillosis)发病率的增加<sup>[10]</sup>。分生孢子是黄曲霉分散传播及感染食物和宿主的主要形态，而致病因子与其孢子形成和次级代谢相关<sup>[10]</sup>。目前已知黄曲霉分生孢子的形成受到 *brlA*、*veA* 和 *velB* 等基因以及全局调控因子 *LaeA* 和 *DmtA* 甲基转移酶的调控<sup>[11-13]</sup>，但其分生孢子色素的生物合成基因尚未确定。本研究以黄曲霉分生孢子色素合成基因为研究目标，利用黄曲霉基因组序列和已知真菌孢子色素合成基因进行序列分析比对，获得黄曲霉孢子色素合成基因 *pks1* 及其所在基因簇，并研究了 *pks1* 基因缺失后对黄曲霉表型、产孢、菌核形成、黄曲霉毒素产生、抗紫外照射和侵染性等的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养基

本研究所用的黄曲霉菌株见表 1，其中黄曲霉 *A. flavus* CA14 PTs 作为受体菌株用于构建目标基因缺失菌株，*A. flavus* Wild-type 菌株作为对照菌株。PDA 培养基(BD Difco, United States)用于菌株活化和孢子收集；GMM 培养基(葡萄糖 10.00 g/L, NaNO<sub>3</sub> 6.00 g/L, KCl 0.52 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.52 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.52 g/L, 酒石酸铵 10 mmol/L, pH 6.5)用于菌丝生长和分生孢子数量测定<sup>[14]</sup>；YES 培养基(Yeast

表 1. 本研究所用的菌株

Table 1. Fungal strains used in this study

Strain	Description	References
<i>A. flavus</i> CA14 PTs	$\Delta ku70; \Delta pyrG$	[16]
<i>A. flavus</i> Wild-type	$\Delta ku70; \Delta pyrG::AfpYrG$	[17]
TYPL1.1	$\Delta ku70; \Delta pyrG; \Delta pks1::AfpYrG$	This study
TYPL 2.1	$\Delta ku70; \Delta pyrG; \Delta rum1::AfpYrG$	This study

TXX = original transformant.

extract 20 g/L, Sucrose 150 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L) 用于产毒素检测<sup>[15]</sup>；WKM 培养基(Yeast extract 2 g/L, Peptone 3 g/L, Corn steep solids 5 g/L, Dextrose 2 g/L, Sucrose 30 g/L, NaNO<sub>3</sub> 2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, KCl 0.2 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, pH 5.5)用于产菌核培养<sup>[11]</sup>。

### 1.2 目标基因的生物信息学和系统进化分析

在 NCBI 数据库中获得已知真菌分生孢子色素合成基因的蛋白序列，利用 NCBI 中的 BLASTp 在线软件对已报道的黑曲霉(*Aspergillus niger*)孢子色素合成骨架基因 *alba* (ANI\_1\_726084)蛋白序列比对分析，确认黄曲霉中分生孢子色素合成基因，并通过 antiSMASH 在线软件分析进而获得该基因所在的基因簇信息<sup>[18]</sup>。根据 NCBI 已有的真菌孢子色素合成基因蛋白序列信息，利用 MEGA 6 软件中 ClustalW 初步处理蛋白序列，并用 Maximum likelihood tree 方法构建进化树，通过分析 100 个重复计算 Bootstrap 支持值。

### 1.3 目标基因缺失菌株的构建

根据获得的黄曲霉假定分生孢子色素合成基因序列设计引物，以黄曲霉基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增敲除基因的同源臂片段，以 *pyrG* 基因作为选择标记基因，通过 Double-Joint PCR 法构建目标基因同源重组片段<sup>[19]</sup>。利用原生质体和 PEG 介导转化法获得黄曲霉敲除转化子<sup>[20]</sup>，并通过多对引物进行 PCR 鉴定，获得正确的目标基

因缺失菌株。PCR 仪为 Bio-Rad 公司的 T100<sup>TM</sup> 聚合酶(Transgene Biotech, 北京)。本研究所用引物 Thermal cycler, 所用酶为 TransStart FastPfu DNA 物序列见表 2。

表 2. 本研究中所用的引物

Table 2. PCR primer sets used in this study

Name	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Uses
KO <i>pks1</i> _5f_F	GCATCGCTATGAAACTCG	<i>pks1</i> deletion and probe
KO <i>pks1</i> _5f_R	GGGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCCCTATCGTTCATATGGC	
KO <i>pks1</i> _3f_F	GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACGGTCAAGAAAGTGCCAGTC	
KO <i>pks1</i> _3f_R	TTGCCGTTGCTCCGATGT	
<i>pks1</i> 5F_F	AGACGGCTCGGGAAGATA	<i>rum1</i> deletion and probe
<i>pks1</i> 3F_R	GGCATACTGCGTGGAAAA	
KO <i>rum1</i> _5f_F	CGGGGTTCAAATTACTGC	
KO <i>rum1</i> _5f_R	GGGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCATTGGCGCTTCATGGGTT	
KO <i>rum1</i> _3f_F	GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACCGATCTGATCGTGAGCGGAAG	gene deletion
KO <i>rum1</i> _3f_R	CAGATGGACCTGTGAAGATGC	
<i>rum1</i> 5F_F	GCGTGCGGCATATCTCATTG	
<i>rum1</i> 3F_R	CTCGTCACATCTCACCGTTTG	
<i>pyrG</i> _F	GCCTCAAACAATGCTCTTCACCC	<i>pks1</i> mutant screen
<i>pyrG</i> _R	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC	
<i>pks1</i> RT_F	GGTTACCACTGTGGCATCTC	<i>rum1</i> mutant screen
<i>pks1</i> RT_R	CATGATCCACGGTCTTTTTG	
<i>rum1</i> RT_F	CAACTGGAGCCATTGACCTG	RT-PCR for AFB1 biosynthesis cluster
<i>rum1</i> RT_R	GCCAATCGCAGATAGGACAG	
<i>afIO/qRT-F</i>	GTCTTTGCCAACTCGGATGC	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
<i>afIO/qRT-R</i>	ACATGGTTAGGTCCTGCCC	
<i>afIS/qRT-F</i>	CCAGACTCGGCCTTAGCTTC	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
<i>afIS/qRT-R</i>	CGTGGAGGATACGCTCACTC	
<i>afIR/qRT-F</i>	CTCAAGGTGCTGGCATGGTA	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
<i>afIR/qRT-R</i>	GGCTGGTCTTCCTCATCCAC	
<i>afID/qRT-F</i>	TCCTTGGTCGCCCATATCAG	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
<i>afID/qRT-R</i>	CCAACATGCACGACTATGCG	
<i>afIC/qRT-F</i>	ACGACGCTTACCATGGAGTG	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
<i>afIC/qRT-R</i>	GTACTCAGACACAGACCGGC	
6120/qRT-F	TTATCGGTTCCAGCTCGGC	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
6120/qRT-R	AATACGATGCCAGTAGCGCA	
6150/qRT-F	AAGAGAAGTGCTGTCGGTGG	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
6150/qRT-R	GCGTACTCGTCCAGATACTCC	
6160/qRT-F	ATGCAAACCCGCTTACAGGA	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
6160/qRT-R	GCGCTCATCCTTTAGCTTGC	
6170/qRT-F	GCCTTTGAACCGCCAACAG	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
6170/qRT-R	CGCACTTATGTGAGGATGCAG	
6180/qRT-F	AGGTGGAACCTTTGAGTCGT	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
6180/qRT-R	GTACATTGTCCTGGAGCCGA	
6230/qRT-F	GTGGGAGTGGAAGTACCGTG	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
6230/qRT-R	CAATGAGATATGCCGCACGC	
6240/qRT-F	CGCCAATCGCAGATAGGACA	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
6240/qRT-R	GGGAAATCACGGAAGCGAGA	
<i>actin-F</i>	ACGGTGTCTCACAACTGG	RT-PCR for conidial pigment biosynthesis cluster
<i>actin-R</i>	CGGTTGGACTTAGGGTTGATAG	

#### 1.4 生长发育测定

根据文献提供的多种方法对突变株分生孢子产量、菌落生长速度和菌核形成及产量研究黄曲霉生长发育情况进行了研究<sup>[13-15]</sup>。在加有 20 mL GMM 培养基的直径为 90 mm 培养皿中央点接种 1  $\mu\text{L}$  浓度为  $10^6$  conidia/mL 的黄曲霉分生孢子悬浮液, 在 29 °C 黑暗培养 7 d 后分别测量分生孢子产量和菌落直径<sup>[14]</sup>。在加有 20 mL WKM 培养基的直径为 90 mm 的培养皿中央点接种 1  $\mu\text{L}$  浓度为  $10^6$  conidia/mL 的黄曲霉分生孢子悬浮液, 37 °C 黑暗培养 7 d 后, 用 75%乙醇喷洒平板表面去除分生孢子, 然后在 Asana 显微镜下计数菌核数<sup>[17]</sup>。上述实验均重复 3 次。

#### 1.5 RNA 提取和定量 RT-PCR

将黄曲霉对照菌株和突变株分别接种在 GMM 和 YES 固体培养基(培养基表面放玻璃纸便于收集菌体)上 25 °C 培养 7 d, 用 TranZol™ 试剂盒(Transgen Biotech, China)提取菌丝体总 RNA, 利用 Fast Quant RT 试剂盒(Tiangen Biotech, China)进行反转录获得单链 cDNA, 利用 CFX96 实时系统(Bio-Rad)进行 qRT-PCR 分析。具体操作参照 KAPA SYBR FAST qPCR 试剂盒说明书进行, 反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 3 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环; 然后 65 °C 循环 5 s, 并保持 95 °C 以计算解离曲线。每个 cDNA 样品一式 3 份进行, 并计算平均阈值循环。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算相对表达水平<sup>[8]</sup>, 最后将结果标准化为 Actin 蛋白基因(GenBank No.: AFLA\_055230)的表达水平。所用引物在表 2 列出。

#### 1.6 抗紫外线照射能力测定

黄曲霉菌株在 PDA 培养基上 37 °C 培养 4 d 后, 用浓度为 0.1% Tween-80 水溶液收集分生孢

子, 取 40  $\mu\text{L}$  浓度为  $2.5 \times 10^3$  conidia/mL 的孢子悬液接种在含有 PDA 培养基的 90 mm 培养皿上, 并将培养皿分别暴露于 0、20、50、100 J/m<sup>2</sup> 的剂量紫外线(UV)下, 然后在 37 °C 培养 24 h, 显微镜观察孢子萌发<sup>[21]</sup>。所有实验均以 3 次重复进行, 未照射的平板作为对照。UV 光由 UV 交联机(UVP-CL1000 Ultraviolet Crosslinker)提供, 紫外光波长为 254 nm, 照射时间由 UV 剂量决定。使用软件 GraphPad Prism 7.0 根据 Two-Way ANOVA 多重比较测试在  $P < 0.001$  下分析数据。

#### 1.7 黄曲霉毒素分析

利用薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)确定菌株黄曲霉毒素(aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>)的产生<sup>[22]</sup>。先用氯仿提取培养物中的次级代谢产物, 然后在 TLC 薄层层析板上用丙酮: 氯仿(1: 9, V/V)溶剂系统作为展开剂对其中的 AFB<sub>1</sub> 进行分析鉴定, 同时用 AFB<sub>1</sub> 标准品作为对照, AFB<sub>1</sub> 在 365 nm 的紫外激活下显示出蓝色特异斑点。

#### 1.8 种子侵染测定

以花生和玉米种子作为实验材料进行黄曲霉对种子侵染测验, 具体操作参照文献进行<sup>[23]</sup>。除去花生和玉米种子胚芽而不损坏任何子叶组织后进行表面消毒, 消毒步骤为: 0.05%次氯酸钠溶液灭菌 3 min  $\rightarrow$  无菌水洗涤 30 s  $\rightarrow$  70%乙醇灭菌 5 s  $\rightarrow$  无菌水洗涤 30 s。种子消毒后沥干, 然后每 40 粒种子分别浸入 40 mL 0.1% Tween-80 分生孢子悬浮液中( $10^5$  conidia/mL), 浸入不含分生孢子的 40 mL 0.1% Tween-80 无菌水溶液的种子为空白对照, 在摇床上以 50 r/min 摇动 30 min, 然后将花生和玉米种子分别置于 90 mm 培养皿中, 每个培养皿摆放 10 粒玉米或 10 瓣花生, 每个菌株 3 个平行, 在 29 °C 黑暗条件下孵育 7 d。所用培

养皿衬有 1 片湿滤纸(形成湿度室)以保持高湿度, 滤纸每天用无菌水润湿, 最后将种子收集到 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 0.1% Tween-80 无菌水涡旋 3 min 洗涤种子表面分生孢子, 取 100  $\mu$ L 孢子悬浮液稀释后使用血球计数板计数。分别再加入 10 mL 氯仿提取黄曲霉毒素, 使用薄层色谱法进行结果分析。上述实验重复 3 次。

## 2 结果和分析

### 2.1 黄曲霉分生孢子色素合成基因的生物信息学分析

以黑曲霉孢子色素合成骨架基因 *alba* (ANI\_1\_726084)蛋白序列为探针搜索黄曲霉 *A.*

*flavus* NRRL3357 的基因组测序数据(GenBank No.: AAIH00000000.2), 获得假定的分生孢子色素生物合成基因 *pks1* (AFLA\_006170), 然后利用 antiSMASH 在线分析预测黄曲霉 *pks1* 基因所在基因簇。结果显示, 该基因簇含有 NAD 合成酶(AFLA\_006120)、NADH 焦磷酸酶(AFLA\_006130)、黄素依赖性单加氧酶(AFLA\_006150)、预测的 HDA1 复合亚基(AFLA\_006160)、PKS 基因(AFLA\_006170, *pks1*)、外切聚磷酸酶(AFLA\_006220)、羧酸脱氨酶(AFLA\_006230)和转录因子(AFLA\_006240, *rum1*)各 1 个, 以及 2 个氧化酶(AFLA\_006180 和 AFLA\_006190)(图 1)。该基因簇的 10 个基因与米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的孢子色素合成基因簇基

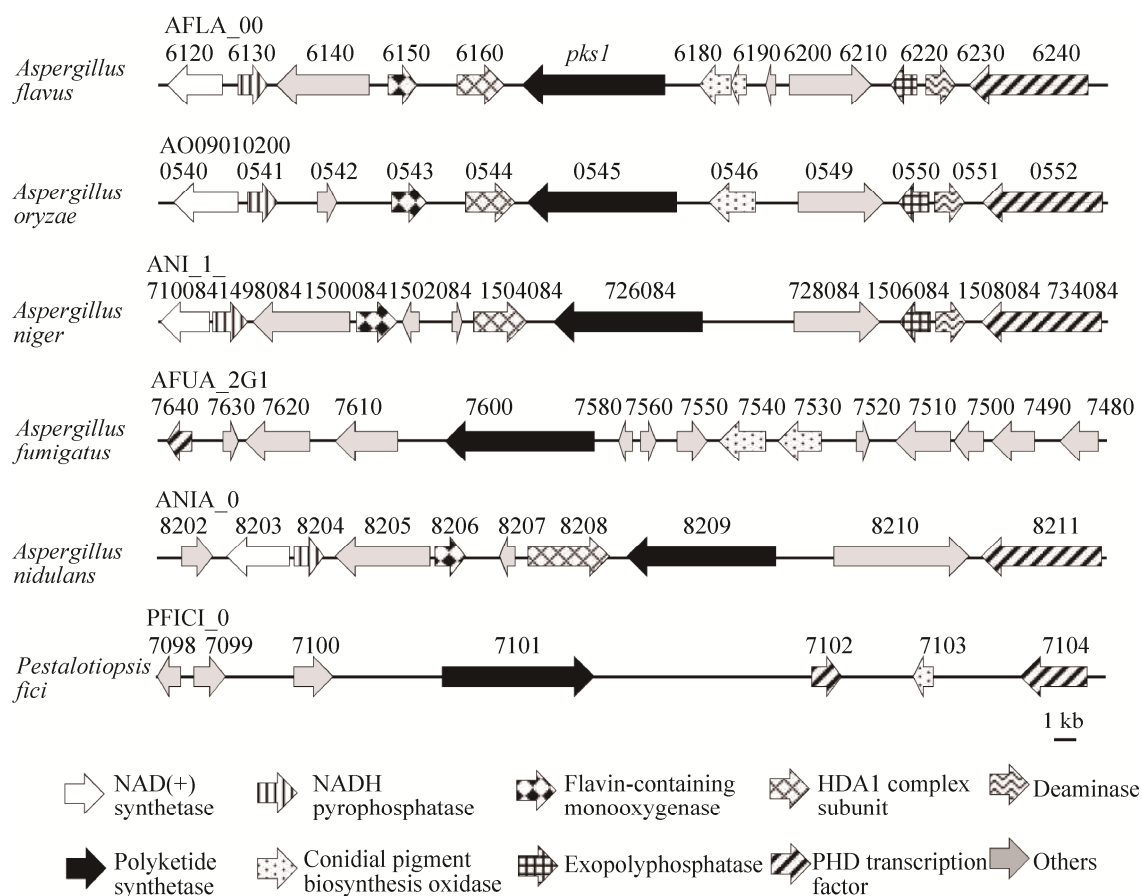


图 1. 黄曲霉分生孢子色素合成基因 *pks1* 基因簇的同源性比对

Figure 1. Homologue alignment of *pks1* cluster in *A. flavus*.

因高度保守, 其中 *pks1* 为该基因簇的骨架基因, 与 *A. niger* (ANI\_1\_726084, *albA*)、*A. nidulans* (AN8209, *wA*)和 *A. fumigatus* (AFUA\_2G17600, *alb1*)的黑色素生物合成基因相似性均在 73%以上, 而非曲霉属的真菌 *P. fici* 黑色素生物合成基因(PFICI\_07101, *PfmaE*)的相似性仅为 44% (表 3)。将 *pks1* 基因与已知真菌分生孢子色素合

成基因的编码蛋白序列进行系统发育进化分析, 结果显示, 曲霉属真菌属于同一个进化分支, 且 *A. flavus* 与 *A. oryzae* 的距离最近, 与已知的 *Alternaria alternata* (Alm)、*Magnaporthe oryzae* (MGG\_07219)及 *P. fici* 黑色素合成基因距离较远 (图 2)。上述结果表明黄曲霉中分生孢子色素合成途径应为类似于黑色素的 1-DHN 合成途径。

表 3. 黄曲霉分生孢子色素合成基因簇与不同真菌的比对分析

Table 3. Gene prediction through deep bioinformatic analysis of the *pks1* cluster in different fungi

Protein of <i>Aspergillus flavus</i>	Coverage/identity to gene of strains/%					Putative function
	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Pestalotiopsis fici</i>	
AFLA_006120	AO090102000540 (100/93)	ANI_1_710084 (100/89)	–	AN8203 (100/83)	–	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase
AFLA_006130	AO090102000541 (100/99)	ANI_1_1498084 (100/79)	–	AN8204 (100/79)	–	NADH pyrophosphatase
AFLA_006150	AO090102000543 (95/90)	ANI_1_1502084 (95/59)	–	AN8206 (95/56)	–	Flavin-containing monooxygenase
AFLA_006160	AO090102000544 (100/99)	ANI_1_724084 (98/68)	–	AN8208 (99/61)	–	HDA1 complex subunit
AFLA_006170 ( <i>pks1</i> )	AO090102000545 (100/99)	ANI_1_726084 (100/75)	AFUA_2G17600 (100/73)	AN8209 (100/73)	PFICI_07101 (99/44)	Polyketide synthetase PksP
AFLA_006180	AO090102000546 (99/99)	–	AFUA_2G17530 (99/48)	–	PFICI_07103 (11/80)	Conidial pigment biosynthesis oxidase Arb2/brown2
AFLA_006220	AO090102000550 (100/100)	ANI_1_1506084 (98/53)	–	–	–	Exopolyphosphatase
AFLA_006230	AO090102000551 (100/99)	ANI_1_1508084 (88/57)	–	–	–	1-aminocyclopropane-1-carbo xylate deaminase
AFLA_006240 ( <i>rum1</i> )	AO090102000552 (100/99)	ANI_1_734084 (100/87)	AFUA_2G17640 (9/26)	AN8211 (99/79)	PFICI_07104 (11/43)	PHD transcription factor

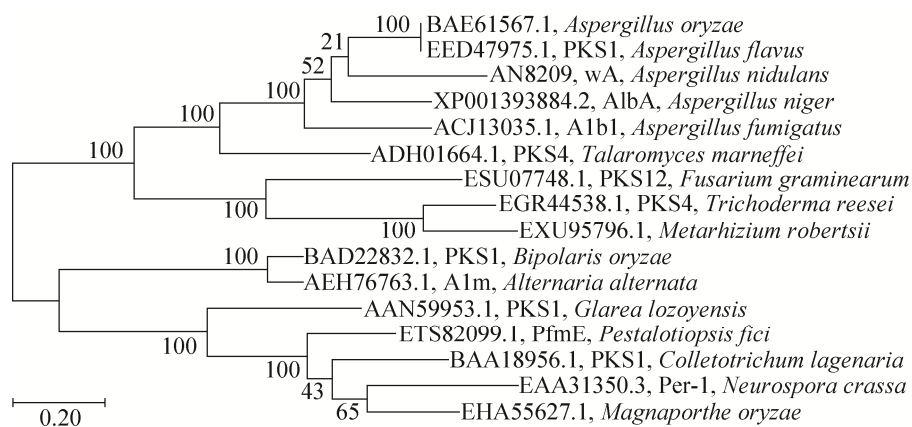


图 2. 不同真菌中 PKS1 同源蛋白的系统进化关系分析

Figure 2. Phylogenetic analysis of PKS1 homologous protein from different fungi.

## 2.2 黄曲霉分生孢子色素合成基因(*pks1*)缺失菌株的构建

生物信息学分析表明, 黄曲霉分生孢子色素合成基因 *pks1* (AFLA\_006170) 可读阅读框为 6651 bp, 编码蛋白为 2141 个氨基酸。利用分子遗传技术及原生质体转化方法构建了 *pks1* 缺失菌株(图 3-A), 提取转化子的基因组 DNA, 通过 PCR 的方法验证阳性转化子(图 3-B)。采用相同的方法获得转录因子 Rum1 基因缺失的菌株。

## 2.3 *pks1* 是黄曲霉分生孢子色素合成的关键基因

为验证 *pks1* 基因是否是黄曲霉分生孢子色素合成的关键基因, 将 WT 和  $\Delta pks1$  菌株接到 GMM 培养基上于 29 °C 培养 7 d。结果显示  $\Delta pks1$  突变株的生长菌落变为白色, 即分生孢子没有绿色色素产生(图 4-A)。结果表明, *pks1* 是黄曲霉分生孢子色素合成的关键基因。在相同的培养条件下测

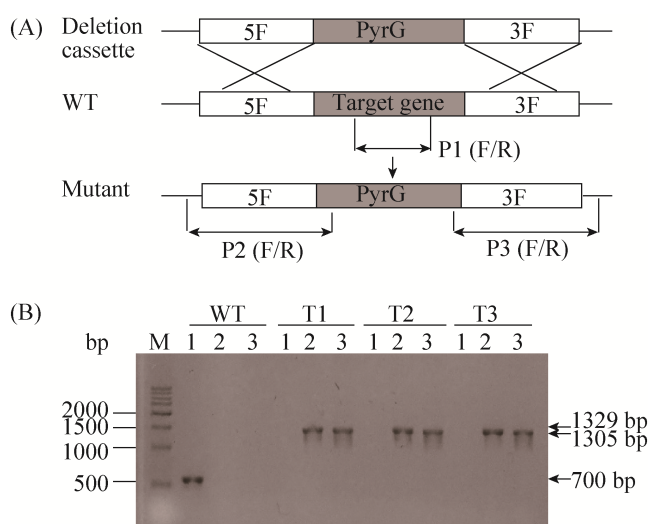


图 3. 黄曲霉 *pks1* 缺失株的构建

Figure 3. Generation of *pks1* deletion mutant in *A. flavus*. A: Schematic illustration for *pks1* disruption; B: Verification of  $\Delta pks1$  mutants by diagnostic PCR. The two specific bands were detected in  $\Delta pks1$  mutants (T1–T3) but not in WT.

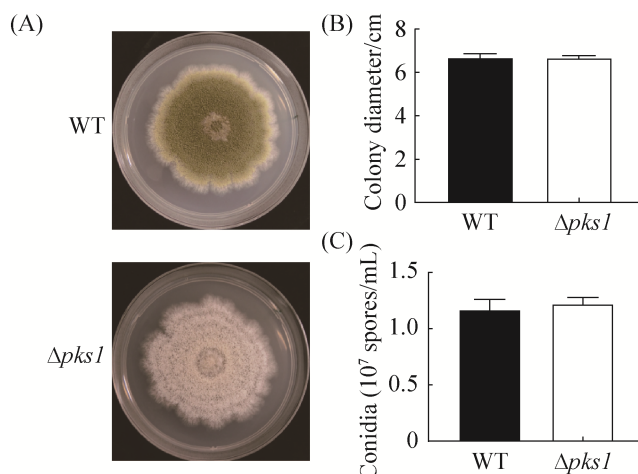


图 4. 亲本菌株和  $\Delta pks1$  突变株菌落生长及分生孢子产生

Figure 4. Morphology, sporulation and growth of WT and  $\Delta pks1$  mutant. A: Phenotypes of WT and  $\Delta pks1$  strains; B: Colony diameter of WT and  $\Delta pks1$  strains; C: Conidia production of WT and  $\Delta pks1$  strains.

定菌落生长直径和分子孢子产量, 结果发现,  $\Delta pks1$  突变株与 WT 对照菌株相比没有显著的差异(图 4-B, C), 表明 *pks1* 基因的缺失不影响菌落生长和分生孢子产生。

## 2.4 *pks1* 基因不参与菌核的形成

为确定缺失 *pks1* 基因是否对黄曲霉菌核形成产生影响, 将 WT 和  $\Delta pks1$  菌株接到 WKM 培养基于 29 °C 黑暗培养 7 d 后, 用 75% 酒精洗去菌落表面菌丝和孢子, 观察其菌核表型变化, 并进行菌核计数。结果显示,  $\Delta pks1$  菌株和 WT 对照菌株相同, 均产生菌核(图 5-A), 而且两者产生的菌核数目也没有显著的差异(图 5-B)。可见, *pks1* 基因的缺失不参与黄曲霉菌核的形成。

## 2.5 黄曲霉分生孢子色素影响对紫外线照射的耐受性

利用不同的 UV 剂量照射分生孢子测定萌发率。结果显示, 在不进行 UV 照射的情况下(0 J/m<sup>2</sup>),

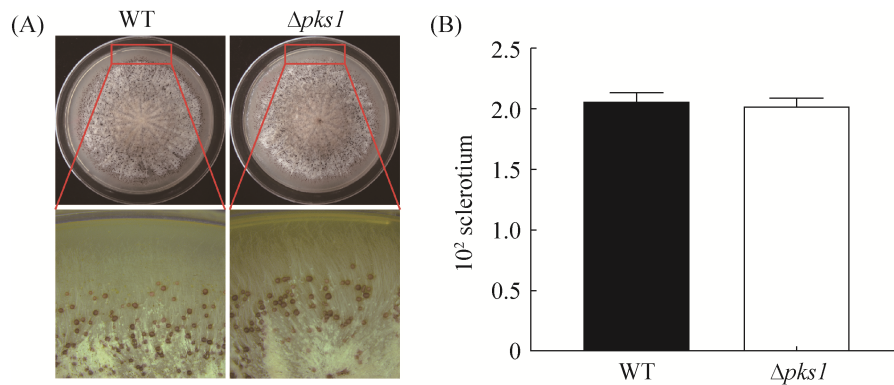


图 5. *pks1* 基因缺失对黄曲霉菌核形成的影响

Figure 5. Effect of *pks1* disruption on sclerotia production in *A. flavus*. A: Colony morphology of WT and  $\Delta pks1$  strains; B: Sclerotia production of WT and  $\Delta pks1$  strains.

WT 对照菌株和  $\Delta pks1$  突变菌株分生孢子的萌发率没有差异。当 UV 能量提高到 20 和 50 J/m<sup>2</sup> 时, 与 WT 对照菌株相比,  $\Delta pks1$  菌株的萌发率显著降低; 当 UV 能量提高到 100 J/m<sup>2</sup> 时,  $\Delta pks1$  菌株的孢子萌发率急剧下降(图 6)。由此表明, *pks1* 的缺失严重影响了黄曲霉分生孢子抵御紫外线辐射的能力。

## 2.6 转录因子 Rum1 是黄曲霉分生孢子色素的生物合成非关键性调控因子

为研究黄曲霉中转录因子 Rum1 是否对分生孢子色素合成有调控作用, 利用 qRT-PCR 分析了 WT

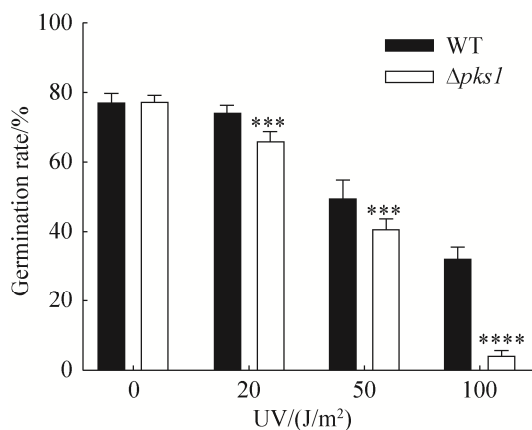


图 6.  $\Delta pks1$  突变菌株影响黄曲霉分生孢子对紫外线耐受性

Figure 6.  $\Delta pks1$  mutant affects the sensitivity of spores to UV in *A. flavus*. \*\*\* $P \leq 0.01$ .

和  $\Delta rum1$  (TYPL2.1) 菌株分生孢子色素合成基因所在基因簇中的基因(AFLA\_006120、AFLA\_006150、AFLA\_006160、*pks1*、AFLA\_006180 和 AFLA\_006230) 的转录水平的表达情况。结果发现, 分生孢子色素生物合成的关键基因 *pks1* 的表达在 *rum1* 缺失突变菌株中呈下调趋势(图 7), 但 *rum1* 缺失突变菌株分生孢子色素与亲本及菌株相比并没有明显变化, 表明转录因子 Rum1 并非是黄曲霉分生孢子色素生物合成的关键性调控因子。

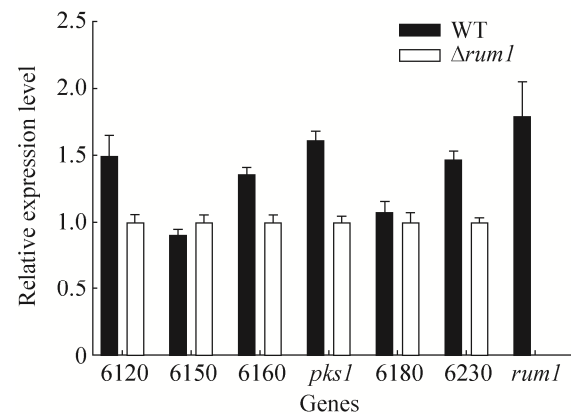


图 7. 转录因子 Rum1 缺失对黄曲霉色素合成基因转录水平的影响

Figure 7. Effect of *rum1* deletion on transcriptional levels of conidial pigment biosynthesis genes in *A. flavus*.



## 2.7 *pks1* 对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的生物合成无显著性影响

为探究 *pks1* 缺失对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 生物合成的作用, 将 WT 和  $\Delta pks1$  菌株接到 YES 固体培养基中于 29 °C 培养 7 d, 收集样品并利用 TLC 法测定 AFB<sub>1</sub> 的产量。结果表明, 与 WT 对照菌株相比,  $\Delta pks1$  突变菌株中 AFB<sub>1</sub> 产生量没有显著变化(图 8-A, B)。利用 qRT-PCR 分析 AFB<sub>1</sub> 生物合成相关基因(*aflR*、*aflS*、*aflC*、*aflD* 和 *aflO*)的表达水平, 结果发现, 与 WT 对照菌株相比, 调控基因 *aflR/S* 和甲基转移酶基因 *aflO* 表达水平在  $\Delta pks1$  菌株中显著上调, 还原酶基因 *aflD* 的表达水平下调, 而突变菌株中 AFB<sub>1</sub> 合成途径中关键前体 Norsolorinic acid (NOR)合成基因 *aflC* 的表达水平并无显著性差异(图 8-C)。由此表明, *pks1* 缺失对 AFB<sub>1</sub> 的产量无明显影响。

## 2.8 *pks1* 缺失影响黄曲霉对农作物种子的侵染能力

为检测 *pks1* 缺失是否影响黄曲霉分生孢子对农作物种子侵染性, 分别将玉米和花生与 WT 和  $\Delta pks1$  突变菌株的分生孢子悬浮液混合, 在 29 °C

培养 7 d 后观察和计数分生孢子, 并检测黄曲霉侵染后的玉米和花生种子中 AFB<sub>1</sub> 的产生。结果显示, 与 WT 对照菌株相比,  $\Delta pks1$  突变菌株侵染的玉米和花生中 AFB<sub>1</sub> 产量与 WT 菌株相比均没有显著的变化(图 9-C, D), 但  $\Delta pks1$  突变菌株产生分生孢子数量明显减少(图 9-A, B)。可见,  $\Delta pks1$  突变菌株的分生孢子对玉米和花生种子的侵染传播效果显著下降, 分生孢子色素合成基因 *pks1* 的缺失影响了黄曲霉对农作物种子的侵染能力。

## 3 讨论

真菌分生孢子色素参与细胞壁的形成, 并帮助真菌抵御氧化胁迫、紫外线照射、土壤变形虫吞噬、菌核的生存胁迫等各种环境胁迫因子<sup>[24]</sup>, 真菌孢子色素合成机制的阐明对于理解重要真菌类群如何抵御环境胁迫及其致病性十分重要。本研究在对已知真菌孢子色素合成基因进行生物信息学分析的基础上, 获得黄曲霉中孢子色素合成的同源基因 *pks1* 及其所在基因簇, 通过基因敲除的方法获得 *pks1* 基因缺失的突变菌株, 并证实了黄曲霉 *pks1* 基因是其分生孢子色素合成的关键基

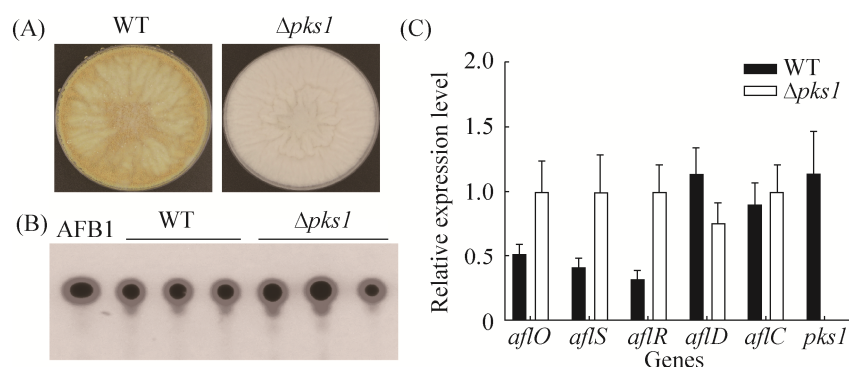


图 8.  $\Delta pks1$  突变菌株对黄曲霉毒素合成的影响

Figure 8. Effect of *pks1* deletion on the aflatoxin biosynthesis in *A. flavus*. A: Phenotypic characterization of WT and  $\Delta pks1$  strains; B: AFB<sub>1</sub> production of WT and  $\Delta pks1$  strains by TLC assay; C: Transcriptional levels of aflatoxin biosynthesis related genes in WT and  $\Delta pks1$  strains.

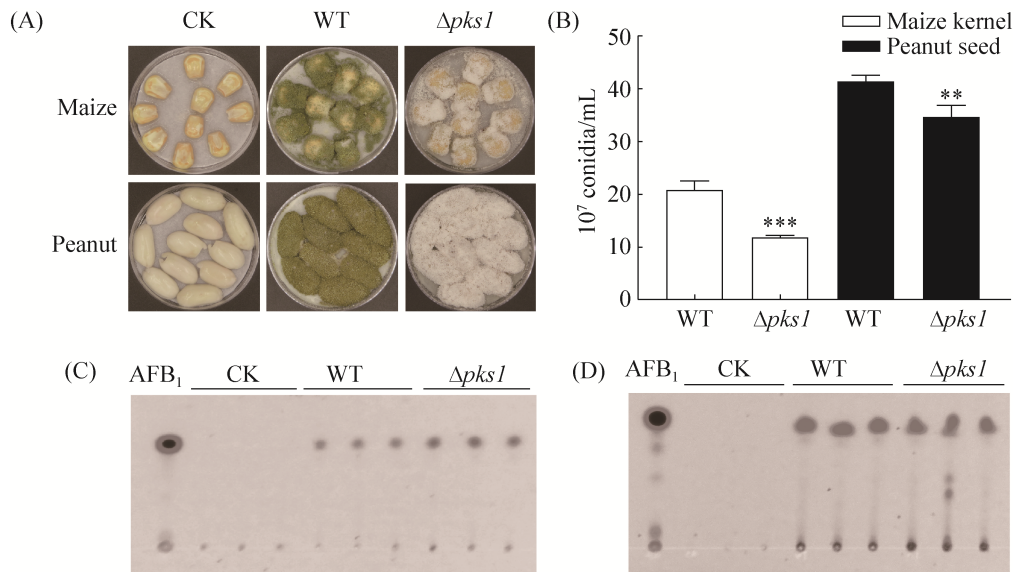


图 9.  $\Delta pks1$  突变菌株对玉米和花生种子的侵染性及产黄曲霉毒素的影响

Figure 9. Effect of *pks1* deletion on infectivity and aflatoxin production on the maize and peanut seeds. A: Infectivity on peanut and maize seeds by WT and  $\Delta pks1$  strains; B: Quantification of conidia from the infected peanut and maize seeds; C: AFB<sub>1</sub> production in infected maize seeds by TLC assay; D: AFB<sub>1</sub> production in infected peanut seeds by TLC analysis. \*\* $P \leq 0.01$ .

因, *pks1* 基因缺失不能影响分生孢子产量和真菌的生长, 但降低了黄曲霉对于紫外线照射的抵抗能力和粮食种子的侵染性。

真菌分生孢子色素的合成机制比较复杂, 其中黑色素生物合成途径主要包括 1,8-二羟基萘(DHN)和 1-3,4-二羟基苯丙氨酸(1-DOPA)两种途径, 前者需要聚酮合成酶基因、scytalone 脱水酶基因和 1,3,8-THN 还原酶基因的参与。基因组序列分析结果表明, 1,8-DHN-黑色素生物合成途径在曲霉属真菌中多是保守的<sup>[24]</sup>。然而, 近年来发现土曲霉缺乏合成 DHN 类型黑色素的基因, 而其色素 aspmelanin 是由 NRPS 类型基因 *melA* 参与负责合成的<sup>[7]</sup>, 构巢曲霉中 NRPS 类型基因 *ivoA*(AN10576)则与其灰棕色分生孢子色素的生物合成有关<sup>[25]</sup>, 这些研究丰富了我们对真菌色素合成机制的认识。本研究所鉴定的黄曲霉孢子色

素合成基因 *pks1* 与黑曲霉 *alba* 基因、烟曲霉 *alb1* 基因、构巢曲霉 *wA* 基因具有高度的保守性和相似性(表 3 和图 2), 分生孢子色素合成途径属于黑色素的 1,8-二羟基萘(DHN)途径。

孢子色素影响真菌分生孢子的发育、紫外线耐受性及致病性。如: 链格孢菌 (*Alternaria alternata*)中黑色素生物合成基因 *alm* 和 *brm2* 均可以恢复稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)黑色素缺陷型突变体的致病性<sup>[26]</sup>, 敲除 *brm2* 基因则影响链格孢菌分生孢子的发育和紫外线耐受性<sup>[27]</sup>; 链格孢菌黑色素生物合成基因 *pks* 在昆虫病原菌绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*)中的异源表达增加了菌株的毒力<sup>[28]</sup>; 小孢拟盘多毛孢菌 (*Pestalotiopsis microspora*) *pks* 基因参与的黑色素生物合成对分生孢子具有负面作用, 但对维持细胞的完整性和生存能力也非常重要<sup>[29]</sup>。本研究中发现色素基因

*pks1* 的缺失虽不影响黄曲霉毒素的产量, 但能降低黄曲霉的侵染性, 这与烟曲霉中同源基因 *alb1* 敲除后降低了其致病传染性的结论相似<sup>[30]</sup>。此外, 真菌分生孢子色素的合成受转录因子等多方面因素的调控, 如烟曲霉分生孢子黑色素的产生受 bHLH DevR 和 MADS-box RlmA 两个转录因子的调控<sup>[31]</sup>。我们发现黄曲霉中的转录调控因子 Rum1 与分生孢子色素合成基因 *pks1* 在同一基因簇中, 该转录因子在菌丝体、分生孢子、菌核生长以及黄曲霉毒素生物合成中起作用<sup>[17]</sup>, 然而本研究发现转录因子 Rum1 的缺失并未影响突变菌株分生孢子色素的产生, 表明该转录因子 Rum1 不是黄曲霉分生孢子色素生物合成的关键性调控因子。因此, 黄曲霉分生孢子色素合成基因 *pks1* 的表达调控机制有待于进一步深入研究。

构巢曲霉的白色和黄色孢子颜色突变菌株已被广泛用于鉴定和表征基因及其编码的色素合成的蛋白质, 而烟曲霉孢子颜色突变菌株则被用于研究 DHN-黑色素的生物合成途径以及黑色素在其致病性中的作用<sup>[32]</sup>。因此, 黄曲霉孢子色素合成基因的确定和白色孢子突变菌株的获得为深入研究黄曲霉的产毒和侵染机制提供了重要的研究工具。

## 参 考 文 献

[1] Liu GY, Nizet V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(9): 406–413.

[2] Avalos J, Carmen Limón M. Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*, 2015, 61(3): 309–324.

[3] Cary JW, Harris-Coward PY, Ehrlich KC, di Mavungu JD, Malysheva SV, de Saeger S, Dowd PF, Shantappa S, Martens SL, Calvo AM. Functional characterization of a *veA*-dependent polyketide synthase gene in *Aspergillus flavus* necessary for the synthesis of asparosone, a

sclerotium-specific pigment. *Fungal Genetics and Biology*, 2014, 64: 25–35.

[4] Pihet M, Vandeputte P, Tronchin G, Renier G, Saulnier P, Georgeault S, Mallet R, Chabasse D, Symoens F, Bouchara JP. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 177.

[5] Akoumianaki T, Kyrmizi I, Valsecchi I, Gresnigt MS, Samonis G, Drakos E, Boumpas D, Muszkieta L, Prevost MC, Kontoyiannis DP, Chavakis T, Netea MG, van de Veerdonk FL, Brakhage AA, El-Benna J, Beauvais A, Latge JP, Chamilos G. *Aspergillus* cell wall melanin blocks LC3-associated phagocytosis to promote pathogenicity. *Cell Host & Microbe*, 2016, 19(1): 79–90.

[6] Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13(4): 708–717.

[7] Geib E, Gressler M, Viediarnikova I, Hillmann F, Jacobsen ID, Nietzsche S, Hertweck C, Brock M. A non-canonical melanin biosynthesis pathway protects *Aspergillus terreus* conidia from environmental stress. *Cell Chemical Biology*, 2016, 23(5): 587–597.

[8] Zhang P, Wang XN, Fan AL, Zheng YJ, Liu XZ, Wang SH, Zou HX, Oakley BR, Keller NP, Yin WB. A cryptic pigment biosynthetic pathway uncovered by heterologous expression is essential for conidial development in *Pestalotiopsis fici*. *Molecular Microbiology*, 2017, 105(3): 469–483.

[9] Sudhakar P, Latha P, Sreenivasulu Y, Reddy BVB, Hemalatha TM, Balakrishna M, Reddy KR. Inhibition of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin (AflB1) in peanut by methyleugenol. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2009, 47(1): 63–67.

[10] Amaike S, Keller NP. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, 49: 107–133.

[11] Chang PK, Scharfenstein LL, Mack B, Ehrlich KC. Deletion of the *Aspergillus flavus* orthologue of *A. nidulans fluG* reduces conidiation and promotes production of sclerotia but does not abolish aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7557–7563.

[12] Chang PK, Scharfenstein LL, Li P, Ehrlich KC. *Aspergillus flavus* VelB acts distinctly from VeA in conidiation and may coordinate with FluG to modulate sclerotial production. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 58–59: 71–79.

[13] Yang KL, Liang LL, Ran FL, Liu YH, Li ZG, Lan HH, Gao PL, Zhuang ZH, Zhang F, Nie XY, Kalayu Yirga S, Wang SH. The DmtA methyltransferase contributes to *Aspergillus flavus*

- conidiation, sclerotial production, aflatoxin biosynthesis and virulence. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23259.
- [14] Lan HH, Sun RL, Fan K, Yang KL, Zhang F, Nie XY, Wang XN, Zhuang ZH, Wang SH. The *Aspergillus flavus* histone acetyltransferase AflGcnE regulates morphogenesis, aflatoxin biosynthesis, and pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1324.
- [15] Yang KL, Qin QP, Liu YH, Zhang LM, Liang LL, Lan HH, Chen CH, You YC, Zhang F, Wang SH. Adenylate cyclase *AcyA* regulates development, aflatoxin biosynthesis and fungal virulence in *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016, 6: 190.
- [16] Chang PK, Scharfenstein LL, Wei QJ, Bhatnagar D. Development and refinement of a high-efficiency gene-targeting system for *Aspergillus flavus*. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 81(3): 240–246.
- [17] Hu YL, Yang G, Zhang DP, Liu YJ, Li Y, Lin GL, Guo ZQ, Wang SH, Zhuang ZH. The PHD transcription factor *Rum1* regulates morphogenesis and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 2018, 10(7): 301.
- [18] Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(S2): W339–W346.
- [19] Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(11): 973–981.
- [20] Zhou ZY, Liu R, Jiang MY, Zhang L, Niu Y, Zhu YC, Dong ZJ, Liu JK. Two new cleistanthane diterpenes and a new isocoumarin from cultures of the Basidiomycete *Albatrellus confluence*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2009, 57(9): 975–978.
- [21] Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(3): 931–940.
- [22] Liu YH, Yang KL, Qin QP, Lin GN, Hu TR, Xu ZL, Wang SH. G protein  $\alpha$  subunit *gpaB* is required for asexual development, aflatoxin biosynthesis and pathogenicity by regulating cAMP signaling in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 2018, 10(3): 117.
- [23] Kale SP, Milde L, Trapp MK, Frisvad JC, Keller NP, Bok JW. Requirement of *LaeA* for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(10): 1422–1429.
- [24] Braga GUL, Rangel DEN, Fernandes ÉKK, Flint SD, Roberts DW. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current Genetics*, 2015, 61(3): 405–425.
- [25] Sung CT, Chang SL, Entwistle R, Ahn G, Lin TS, Petrova V, Yeh HH, Praseuth MB, Chiang YM, Oakley BR, Wang CCC. Overexpression of a three-gene conidial pigment biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* reveals the first NRPS known to acetylate tryptophan. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 101: 1–6.
- [26] Kawamura C, Moriwaki J, Kimura N, Fujita Y, Fuji SI, Hirano T, Koizumi S, Tsuge T. The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin-deficient mutants of *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(4): 446–453.
- [27] Kawamura C, Tsujimoto T, Tsuge T. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, 12(1): 59–63.
- [28] Tseng MN, Chung PC, Tzuan SS. Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13): 4508–4519.
- [29] Yu X, Huo L, Liu H, Chen LF, Wang Y, Zhu XD. Melanin is required for the formation of the multi-cellular conidia in the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *Microbiological Research*, 2015, 179: 1–11.
- [30] Jahn B, Boukhallouk F, Lotz J, Langfelder K, Wanner G, Brakhage AA. Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. *Infection and Immunity*, 2000, 68(6): 3736–3739.
- [31] Valiante V, Baldin C, Hortschansky P, Jain R, Thywißen A, Straßburger M, Shelest E, Heinekamp T, Brakhage AA. The *Aspergillus fumigatus* conidial melanin production is regulated by the bifunctional bHLH *DevR* and MADS-box *RlmA* transcription factors. *Molecular Microbiology*, 2016, 102(2): 321–335.
- [32] Jørgensen TR, Park J, Arentshorst M, van Welzen AM, Lamers G, Vankuyk PA, Damveld RA, van den Hondel CAM, Nielsen KF, Frisvad JC, Ram AFJ. The molecular and genetic basis of conidial pigmentation in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, 48(5): 544–553.

# Identification of conidial pigment synthetic gene *pks1* and its effect on development and pathogenicity in *Aspergillus flavus*

Penglin Wei<sup>1,2</sup>, Peng Zhang<sup>2</sup>, Wei Li<sup>2\*</sup>, Shihua Wang<sup>1\*</sup>, Wen-Bing Yin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fujian Key Laboratory of Pathogenic Fungi and Mycotoxins, School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Objective] The fungal conidial pigments are essential components for the formation of the fungal cell wall. The pigments play very important roles in fungal growth and resistance to various environmental stress responses. Here, the biosynthetic gene of conidial pigment was identified and characterized in *Aspergillus flavus*. [Methods] By the homologous search of the known pigment biosynthetic gene protein, the key gene involved in the pigment production was identified in *A. flavus*. The target gene was disrupted using homologous recombination strategy, and the effects of the gene deletion on fungal phenotype, sporulation, sclerotia formation, aflatoxin production, anti-ultraviolet irradiation and invasiveness were investigated. [Results] Compared with the wild-type strain, the  $\Delta pks1$  mutant lost the conidial color instead of producing the white conidia. No obvious difference was detected in the growth rate, spore yield, formation of stress-resistant structure sclerotia and production of aflatoxin B<sub>1</sub> between WT and  $\Delta pks1$  mutant strains. However, the deletion of *pks1* resulted in a decrease in resistance to UV radiation and the ability to infect corn and peanut seeds. [Conclusion] The *pks1* (AFLA\_006170) is a key gene for conidia pigment production in *A. flavus*. The conidial pigment biosynthetic pathway is related to fungal resistance against UV radiation and the infection to cereal crops.

**Keywords:** *Aspergillus flavus*, conidial pigment, morphological type, UV resistance, infectivity

(本文责编: 李磊)

Supported by the the National Key Research and Development Program (2016YFD0400105)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64806170; E-mail: Wei Li, liw@im.ac.cn, Shihua Wang, wshyyl@sina.com

Received: 15 November 2018; Revised: 23 January 2019; Published online: 13 March 2019