



石怡欣,周雪艳,王琦,等.球毛壳菌 CGMCC 6882 中 *Y1Ste20* 基因敲除重组质粒构建及对菌丝形态的影响[J].轻工学报,2026,41(5):85-93.
Shi Y X,Zhou X Y,Wang Q,et al. Construction of the *Y1Ste20* gene knockout recombinant plasmid in *Chaetomium globosum* CGMCC 6882 and analysis of its effects on mycelial morphology[J]. Journal of Light Industry,2026,41(5):85-93. DOI:10.12187/2026.05.008

球毛壳菌 CGMCC 6882 中 *Y1Ste20* 基因敲除重组质粒构建及对菌丝形态的影响

石怡欣,周雪艳,王琦,王子朝

河南工业大学 生物工程学院,河南 郑州 450001

摘要:【目的】探究基因敲除解脂耶氏酵母 *Ste20* 激酶同源基因(*Y1Ste20* 基因)对球毛壳菌 CGMCC 6882 菌落直径及菌丝形态的调控作用。【方法】采用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术,构建靶向 *Y1Ste20* 基因的敲除重组质粒;通过 PEG 介导的原生质体转化法将该基因敲除重组质粒转入球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体中,获得 *Y1Ste20* 基因敲除菌株,并对其菌落生长特征及菌丝形态进行分析。【结果】利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建 *Y1Ste20* 基因敲除重组质粒(pFC332-5S rRNA-*Ste20* gRNA),并成功转入球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体中,获得 *Y1Ste20* 基因敲除菌株球毛壳菌 XY1104,其在固体培养基上的菌落直径((201.89 ± 9.35) mm)小于球毛壳菌 CGMCC 6882((434.35 ± 10.03) mm),且在液体培养基中的菌丝呈细小短杆状,未发生缠绕,而球毛壳菌 CGMCC 6882 无独立菌丝,易形成菌球。【结论】*Y1Ste20* 基因敲除导致球毛壳菌 CGMCC 6882 的菌落直径减小,菌丝呈细小短杆状并趋于密集生长,缠绕现象减少,表明 *Y1Ste20* 基因能参与调控球毛壳菌 CGMCC 6882 菌丝生长及形态建成。

关键词:球毛壳菌 CGMCC 6882;*Y1Ste20* 基因;基因敲除重组质粒;菌丝形态

中图分类号:TS201.3 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2026)05-0085-09

0 引言

丝状真菌能够产生有机酸、酶制剂及聚酮、生物碱、多肽等多种具有工业或医药价值的天然产物,其在液体发酵中的菌丝形态会直接影响培养液黏度、氧传递效率及产物合成能力^[1]。分散的菌丝易增加发酵液黏度、降低溶氧;而紧凑的菌丝球虽能改善流变学特性,但内部可能形成传质限制区^[2]。因此,调控菌丝形态是提升丝状真菌发酵效率的核心

切入点。

目前,丝状真菌菌丝形态的调控策略主要包括培养基组分调控^[3]、发酵工艺优化^[4]和分子改造^[5]。其中,培养基组分调控和发酵工艺优化虽能在一定程度上改善菌丝形态,但效果不太稳定,且难以从根本上改变丝状真菌的菌丝形态。相比之下,分子改造通过基因工程手段对菌株进行定向改造,能够实现更精准、更稳定的形态控制,已成为该领域的研究热点^[1]。例如,L. Y. Yu 等^[6]研究发现,敲除

收稿日期:2026-01-27;修回日期:2026-04-24;出版日期:2026-10-15

基金项目:河南省重大科技专项项目(231100110300)

作者简介:石怡欣(2001—),女,河南省平顶山市人,河南工业大学硕士研究生,主要研究方向为微生物调控及代谢。E-mail:18768966167@163.com

通信作者:王子朝(1985—),男,河南省林州市人,河南工业大学副教授,博士,主要研究方向为微生物调控及代谢。E-mail:6832917@163.com

mphA 和 *bck1* 激酶基因的黑曲霉菌株会形成更小、更致密的菌落,菌丝呈短杆状,且葡糖淀粉酶分泌显著增加,而敲除 *steC* 激酶基因的黑曲霉菌株,其生长更快。Y. S. Zhou 等^[5] 研究发现,敲除黑曲霉中与菌丝形态形成相关的内源性 α -1,3-葡聚糖合成酶基因(*agsA*、*agsB*)和半乳糖氨基半乳聚糖合成酶基因(*sph3*、*uge3*)后,菌丝颗粒完全分散。韦涵文等^[7] 研究发现,与野生型禾生炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)相比,构建的禾生炭疽菌 *CgrGa3* 基因敲除突变体的菌落生长明显减慢,表明特定基因确实可影响丝状真菌的生长发育过程。综上,针对关键调控基因进行定向改造已成为调控丝状真菌菌丝形态及优化发酵性能的重要策略。

在分子层面,菌丝形态的形成受多条信号通路的协同控制。MAPK 信号通路在菌丝极性生长与分子调控中发挥核心作用^[1]。Ste20 激酶作为 MAPK 通路的关键上游调控因子,在酿酒酵母中通过与小 G 蛋白 Cdc42 互作调控其丝状生长^[8-9],在白色念珠菌中通过 CST20 正向调控菌丝形成和毒力^[10]。因此,Ste20 激酶在不同真菌中主要承担调控菌丝形态的功能。

实验室前期从绞股蓝中分离获得 1 株内生真菌球毛壳菌 CGMCC 6882(*Chaetomium globosum* CGMCC 6882),该菌株在液体深层发酵过程中存在菌丝过长、易相互缠绕形成菌丝球的问题,导致菌球内部氧气及营养物质传递效率较低,这限制了该菌株的进一步应用开发。鉴于此,本研究拟利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术,构建解脂耶氏酵母 Ste20 激酶同源基因(*YISte20* 基因)敲除重组质粒,并将该敲除重组质粒导入球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体中,探究 *YISte20* 基因敲除对其菌落直径及菌丝形态的影响,以期为后续通过分子改造优化该菌株的发酵性能提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

蔗糖、蛋白胨、酵母粉、胰蛋白胨、牛肉膏、酵母提取物等,天津市致远化学试剂有限公司;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、溶壁酶(活力 ≥ 200 U/mg)、

纤维素酶(活力 $\geq 10\ 000$ U/g)、蜗牛酶(复合酶,破壁率 $\geq 80\%$)等,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA)、Tris-HCl 等,北京鼎国昌盛生物技术有限公司;2 $\times$ Phanta Master Mix、潮霉素 B 等,上海生工生物工程股份有限公司;DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,北京博迈德基因技术有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒,康为世纪生物科技有限公司;琼脂糖(电泳级),北京茂健生物技术有限公司;山梨醇,武汉曙尔生物科技有限公司;PEG 4000(色谱纯)、无水 CaCl₂、酶解干酪素等,南通仁达化工有限公司;氨苄西林(分子生物学级),索莱宝生物科技有限公司;dNTP Mixture,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;10 $\times$ Taq Buffer、Ex Taq DNA 聚合酶,日本 TaKaRa 公司;Bgl II 限制性内切酶,中国碧云天生物技术有限公司;pFC332 载体,美国 Addgene 公司;5 $\times$ SE Cloning Buffer,北京庄盟国际生物基因科技有限公司;SE Recombinase,比利时 Gentaur 公司。如无特殊注明,其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

Mastercycler 型 PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;XFH-50CA 型高压蒸汽灭菌锅,诸城市众工机械有限公司;SW-CJ-2F 型超净工作台,东莞市百福盛净化设备科技有限公司;GelDoc XR+型凝胶成像仪、Mini-PROTEAN Tetra 型电泳仪,美国 Bio Rad 公司;TS-2102 型立式双层摇床,上海天呈实验仪器制造有限公司;DW-86L338 型超低温冰箱,美国 Thermo 公司;DHG-9070A 型恒温培养箱,青岛精诚仪器仪表有限公司;Nano Drop 2000 型微量分光光度计,美国 ThermoFisher Scientific 公司;IX53 型倒置显微镜,日本 OLYMPUS 公司;FM-40 型雪花制冰机,常熟雪科公司。

1.3 培养基、缓冲液等制备

1)固体种子培养基:牛肉膏 0.3 g,蔗糖 2 g,酵母粉 0.1 g,蛋白胨 0.5 g,溶于 100 mL 去离子水,pH 值调为 7.2 左右,加 3.6 g 琼脂粉。

2)CTAB 缓冲液:CTAB 4 g,NaCl 16.364 g,加入 20 mL 1 mol/L Tris-HCl 溶液,8 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液,溶于 200 mL 去离子水。

3)LB 液体培养基:胰蛋白胨 0.5 g,NaCl 1 g,酵

母提取物 1 g,溶于 100 mL 去离子水。

4)50×TAE Buffer:Na₂EDTA·2H₂O 18.6 g,Tris 121 g,醋酸 28.5 mL,溶于 500 mL 去离子水。

5)酶解液:蜗牛酶 0.48 g,溶壁酶 0.3 g,纤维素酶 0.12 g,溶于 30 mL 去离子水。

6)STC 缓冲液:山梨醇 0.93 g,CaCl₂ 0.055 5 g,Tris-HCl 2.5 mL,溶于 50 mL 去离子水,pH 值调至 7.5 左右。

7)PEG 转化液:PEG 4000 20 g,无水 CaCl₂ 0.277 5 g,Tris-HCl 2.5 mL,溶于 50 mL 去离子水,pH 值调至 7.5 左右。

8)再生培养基:V(Flask A):V(Flask B):V(Flask C)=1:10:9,其中 Flask A 为酵母浸粉 1 g,酶解干酪素 1 g,溶于 50 mL 去离子水,pH 值调为 8.5 左右;Flask B 为蔗糖 34.2 g,溶于 50 mL 去离子水;Flask C 为 1.78 g 琼脂粉,溶于 50 mL 去离子水。

1.4 实验方法

1.4.1 基因编辑载体靶点引物构建 在 NCBI-Nucleotide 数据库中,获得解脂耶氏酵母 *Ste20* 激酶的核苷酸序列(基因登录号:YALIOF04422p),通过比对球毛壳菌 CGMCC 6882 基因组测序数据库,获得同源性最高的基因 *Y1Ste20*,遵循引物设计原则,构建基因编辑载体靶点所需引物(见表 1),并由北京华大基因科技有限公司合成。

1.4.2 扩增 5S rRNA-Ste20 gRNA 和 Ste20 gRNA-gRNA scaffold 片段 以本实验室前期构建的 pFC 332-P 5S rRNA-gRNA scaffold 载体为模板,扩增 5S rRNA-Ste20 gRNA 片段及 Ste20 gRNA-gRNA scaffold 片段,50 μL 反应体系包括 dNTP Mixture 4 μL,10×Taq Buffer 5 μL,Ex Taq 0.25 μL,pFC 332-P 5S rRNA-gRNA scaffold 2 μL,5S rRNA-F/gRNA scaffold-F 1 μL,5S rRNA-R/gRNA scaffold-R 1 μL,无菌水 36.75 μL。对所得 5S rRNA-Ste20 gRNA 片段及 Ste20 gRNA-gRNA scaffold 片段分别进行琼脂糖凝胶电泳验证,将大小符合预期的条带按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行切胶回收。将回收产物稀释 10 倍,取等量回收产物稀释液为模板,进行重叠延伸 PCR,得到目的基因(5S rRNA-gRNA scaffold)片段。

1.4.3 目的基因纯化 对目的基因片段进行琼脂糖凝胶电泳验证,将大小符合预期的条带按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行切胶回收,获得纯化后的目的基因片段。

1.4.4 酶切载体 采用 Bgl II 限制性内切酶对 pFC332 载体进行酶切,于 37 ℃ 条件下酶解 30 min;酶切产物经琼脂糖凝胶电泳验证后,将大小符合预期的条带按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行切胶回收,获得酶切后的载体。

1.4.5 目的基因与载体重组反应 取 500 ng 纯化后的目的基因片段、100 ng 酶切后的载体,加入 4 μL 5×SE Cloning Buffer、2 μL SE Recombinase,用无菌水补至 20 μL,在 37 ℃ 条件下连接 30 min,获得 *Y1Ste20* 基因敲除重组质粒(pFC332-5S rRNA-Ste20 gRNA)。

1.4.6 重组质粒转化与阳性克隆鉴定 取 10 μL *Y1Ste20* 基因敲除重组质粒,加入 100 μL DH5α 大肠杆菌感受态细胞中,冰浴 30 min,42 ℃ 热激 90 s,再冰浴 5 min,加入 600 μL LB 液体培养基中振荡活化 60 min 后,在 12 000 r/min 条件下离心 1 min,去上清液 500 μL,用剩余 100 μL 上清液混匀沉淀,并将其涂布于含 50 μg/mL 的 LB 固体培养基上,于 37 ℃ 条件下倒置培养 16 h;挑取单菌落接种到含 50 μg/mL 氨苄西林的 LB 液体培养基中,37 ℃ 振荡培养 6 h;以该菌液为模板进行 PCR 扩增,验证阳性转化菌株,PCR 体系及程序同目的基因扩增;PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证后,将条带大小符合预期的菌液交由华大基因测序。

1.4.7 球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体制备 刮取长满平板的球毛壳菌 CGMCC 6882 菌丝,收集到 10 mL 离心管中;用预冷无菌水洗涤,于 4 ℃、5000 r/min 条件下离心 5 min,收集菌体,重复洗涤

表 1 基因编辑载体靶点所需引物

Table 1 Primers required for target sites of the gene editing vector

引物名称	序列
5S rRNA-F	TGGAACAAATGCTGCTTGAGAG
5S rRNA-R	CAGGCGTGCCGTCGGAAGGCATACA-ACAGCGGGGATTCC
gRNA scaffold-F	CCTTCCCGACGGCAGCGCTGTTTATG-AGCTAGAAATAGC
gRNA scaffold-R	AGAGCATGATCAGCACAAAGGC

3 次;用预冷的 0.7 mol/L NaCl 溶液重悬菌体,相同条件下离心收集菌体;将菌体转移至 50 mL 离心管中,加入 20 mL 酶解液,于 37 ℃、120 r/min 条件下酶解 3~4 h,期间用显微镜镜检,待原生质体数量达 1×10^8 个/mL 时,终止反应。后续步骤在冰上进行:将上述酶解液过滤后,于 4 ℃、2000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清液,用 1 mL 0.7 mol/L NaCl 溶液冲洗沉淀并转移至 2 mL 离心管中,相同条件下离心,弃上清液,以 1 mL STC 缓冲液洗涤沉淀 2 次,每次于 4 ℃、2000 r/min 条件下离心 5 min;用 1 mL STC 缓冲液重悬菌体,于 4 ℃ 条件下保存,备用。

1.4.8 原生质体转化与筛选 1) 转化。将原生质体与 *YISte20* 基因敲除重组质粒以体积比 10 : 1 混合均匀,取 110 μ L 混合液加入 150 μ L PEG 溶液中充分混匀;冰浴 10 min 后,将其融入 1 mL PEG 溶液中,于 28 ℃ 条件下孵育 30 min;将混合液加入 10 mL 再生培养基中,于 28 ℃ 条件下正置培养 14 d,每 2 d 记录 1 次。

2) 筛选。在再生培养基表面覆盖等体积含 200 μ g/mL 潮霉素的抗性培养基,于 28 ℃ 条件下正置培养,待转化菌株长出后,切取带菌丝的 0.5 cm×0.5 cm 培养基块,接种至含 200 μ g/mL 潮霉素的固体种子培养基上,以进行筛选。

1.4.9 转化菌株分子鉴定 提取转化菌株的基因组 DNA(gDNA)并以此为模板,扩增潮霉素 B 基因。10 μ L PCR 反应体系为:gDNA 模板 1 μ L、2×Phanta Master Mix 5 μ L、Hyg-F 引物 0.5 μ L、Hyg-R 引物 0.5 μ L、无菌水 3 μ L。对扩增产物进行测序验证,

序列正确则转化成功,为阳性转化菌株;提取其 DNA,在靶点两侧设计引物并进行 PCR 扩增及测序验证。

1.4.10 菌丝生长对比 分别取球毛壳菌 CGM-CC6882 和阳性转化菌株的等量菌丝,接种于固体种子培养基和 LB 液体培养基中。将等量菌丝接种于固体种子培养基平板中央,每皿 1 个接种点,在 28 ℃ 恒温培养箱中倒置培养 7 d,每天测量并记录 1 次;将等量菌丝接种于 LB 液体培养基中,于 28 ℃、180 r/min 摇床振荡培养 6 d,从第 2 d 开始每天记录 1 次。比较 2 种菌株在固体种子培养基和 LB 液体培养基中的菌丝形态,并使用游标卡尺测量菌丝长度。

1.5 数据处理

所有实验均重复 3 次。采用 SnapGene 4.2.4 进行引物设计和序列测序比对,利用 Excel 2019 进行数据处理与统计分析,使用 Origin 2021 作图。

2 结果与分析

2.1 *YISte20* 基因敲除重组质粒构建结果分析

YISte20 基因敲除重组质粒构建结果如图 1 所示,其中, M 代表 Marker,下同;a) 图中 1 代表 5S rRNA-Ste20 gRNA 片段;b) 图中 1 代表 Ste20 gRNA-gRNA scaffold 片段;c) 图中 1 代表 5S rRNA-gRNA scaffold 片段;d) 图中 1 代表阴性对照,2—10 代表菌液样品。由图 1a) 和 b) 可知,5S rRNA-Ste20 gRNA 片段长度为 219 bp,Ste20 gRNA-gRNA scaffold 片段长度为 200 bp。由图 1c) 可知,目的基因

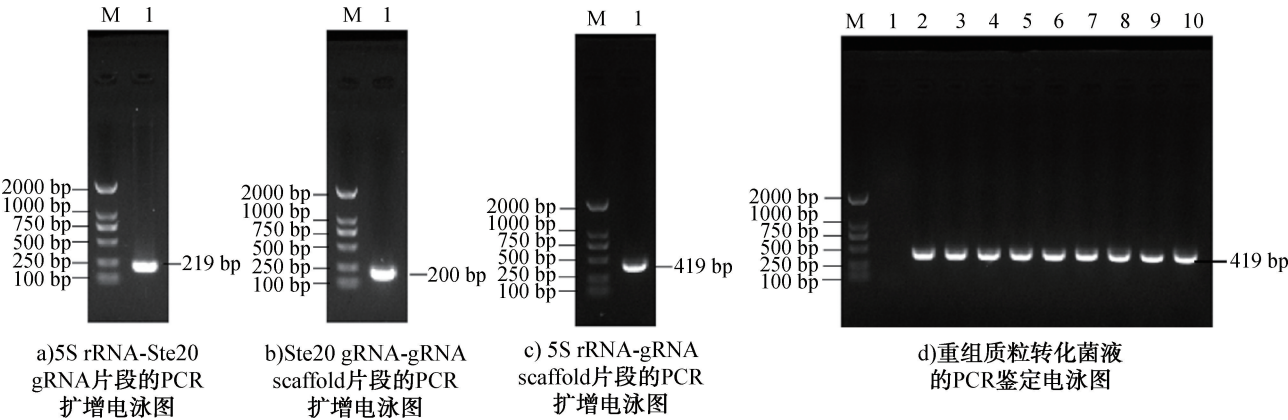


图 1 *YISte20* 基因敲除重组质粒构建结果
Fig. 1 Construction of the *YISte20* gene knockout recombinant plasmid

5S rRNA-gRNA scaffold 片段长度为 419 bp。选取 PCR 产物条带位置和大小正确的菌液(419 bp)进行测序,将测序结果正确的菌液命名为 pFC332-*Y1Ste20*,扩大培养后提取质粒。由图 1d)可知,*Y1Ste20* 基因敲除重组质粒构建成功,命名为 pFC332-5S rRNA-*Ste20* gRNA。该方法与黄淑婷等^[11]构建 YZH81 菌株 *cps2* 基因簇缺失菌的方法一致。

2.2 球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体形态分析

球毛壳菌 CGMCC 6882 菌丝呈白色,将其浸入浅黄色酶解液后,随着酶解时间的延长,酶解液颜色会逐渐加深。球毛壳菌 CGMCC 6882 经酶解处理后的原生质体形态如图 2 所示。由图 2a)可知,10×显微镜下可发现较多原生质体,原生质体数量达 1×10⁸个/mL。由图 2b)可知,40×显微镜下原生质体形态完整无破裂,呈标准圆球状。这表明本研究制备的原生质体能基本满足后续实验的需求。S. Biswas 等^[12]从花生幼苗中分离的原生质体也呈圆球状,表明饱满圆球状是原生质体的典型形态特征。D. Amalamol 等^[13]研究发现,1.2 mol/L MgSO₄ 组合溶解酶+β-葡萄糖酶体系有利于确保原生质体产量和存活率,且原生质体形态为饱满圆球状。本研究使用的酶解液也属于混合酶系,且制备的球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体可用于后续转化实验。

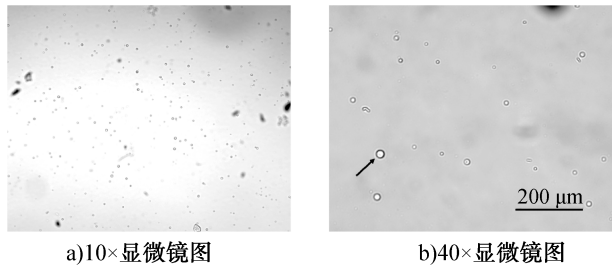


图 2 球毛壳菌 CGMCC 6882 经酶解处理后的原生质体形态

Fig. 2 Morphology of protoplasts derived from *C. globosum* CGMCC 6882 after enzymatic treatment

2.3 球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体转化结果分析

本研究采用 PEG 介导的原生质体转化法成功将 *Y1Ste20* 基因敲除重组质粒导入球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体,其转化结果如图 3 所示。由图 3 可知,培养至第 2 d,培养基为透明状态;培养至第 4 d,培养基逐渐转变为白色,此时可能初步形成白色菌体;培养至第 6~10 d,培养基呈现淡粉色,且颜色逐渐加深,表面出现白色细小菌丝;培养至第 12 d,大面积细小菌丝呈松散状生长,同时出现小面积更明显聚集生长的菌体;培养至第 14 d,培养基颜色呈棕红色,聚集生长的小面积菌体直径增大。这表明球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体在再生培养基上成功实现了转化与再生,证明 PEG 介导的原生质体转化法适用于本菌株。此外,其他学者也基于 PEG 介导方法实现了原生质体转化。例如,S. Biswas 等^[12]研究发现,利用 50 mg/mL PEG 培养 5 min 对花生原生质体转化效果最佳,且质粒浓度也是原生质体转化成败的关键因素;黎伟梦等^[14]通过优化 PEG 介导的原生质体转化流程构建其瞬时表达体系,在 PEG-4000 质量浓度为 50 mg/mL 时转化效率达 54.79%,但 PEG-4000 质量浓度持续提升时转化效率反而显著下降。

2.4 转化菌株筛选结果分析

转化菌株筛选结果如图 4 所示。由图 4 可知,培养至第 2 d,转化菌株仅在 0.5 cm×0.5 cm 培养基块上生长;培养至第 4 d,转化菌株铺满整个培养基块;培养至第 6 d,转化菌株向固体种子培养基扩散生长;培养至第 8 d,原培养基块出现皱缩,菌体以固体种子培养基为主要养分继续生长;培养至第 10 d,固体种子培养基中出现小面积紧密聚集的白色菌体,呈紧密聚集状生长,颜色明显;培养至第 12 d,小面积白色菌体进一步扩大;培养至第 14 d,多数培养

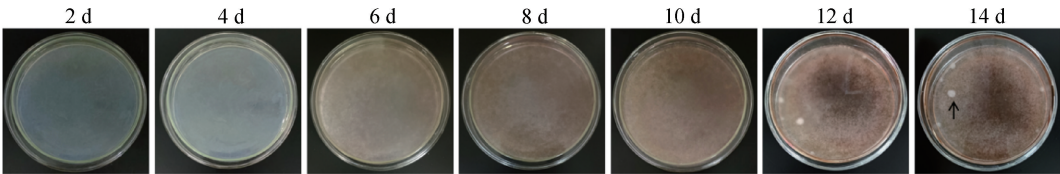


图 3 球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体转化结果

Fig. 3 Results of protoplast conversion of *C. globosum* CGMCC 6882

基块携带的菌体停止生长,小面积白色菌体呈圆形并继续生长。这表明转化菌株可在固体种子培养基上正常生长并形成特征性菌落,为后续阳性转化菌株挑取提供了明显表型依据。类似地,王晶晶等^[15]通过生长表型筛选出生长状态良好的酿酒酵母重组子。本文通过观察转化菌株生长表型完成初步筛选,与上述研究的筛选方法基本一致,表明基于生长表型的筛选方法是微生物遗传转化中常用且有效的手段。

2.5 转化菌株分子鉴定结果分析

转化菌株分子鉴定结果如图 5 所示,其中,a)图中 1 代表球毛壳菌 CGMCC 6882 DNA;b)图中 1 代表转化菌株 DNA;c)图中 1 代表阴性对照,2 代表阳性对照,3—6 代表以转化菌株 gDNA 为模板扩增潮霉素抗性基因,7 代表以球毛壳菌 CGMCC 6882 gDNA 为模板扩增潮霉素抗性基因。由图 5 可知,分别以原始菌株球毛壳菌 CGMCC 6882(见图 5a))和转化菌株(见图 5b))的 gDNA 为模板扩增潮霉素抗性基因,结果如图 5c),泳道 4 条带位置与阳性对照一致,且测序结果正确,表明该 gDNA 对应转化菌

株构建成功,命名为球毛壳菌 XY1104。而泳道 7 中球毛壳菌 CGMCC 6882 的 gDNA 也可以扩增出一条微弱条带,位置略高于阳性对照,这可能是由引物与该菌株 gDNA 中具有结合位点所致。在微生物遗传改造研究中,PCR 扩增与测序验证是鉴定转化菌株最常用且可靠的手段。例如,C. Jiang 等^[16]在解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)基因敲除研究中,运用 PCR 分子验证 *cobA* 基因和 *ituABCD* 基因的敲除;S. X. Liu 等^[17]通过对转化菌落进行 PCR 筛选,成功获得地衣芽孢杆菌基因缺陷菌株;席凯飞等^[18]对拟轮枝镰孢菌(*Fusarium verticillioides*)转化子进行 PCR 鉴定,根据条带大小与预期是否一致判断基因敲除是否成功。本研究的鉴定方法与上述研究一致,其结果证明球毛壳菌 XY1104 的构建成功且可靠。

2.6 菌落直径及菌丝形态对比分析

菌落直径及菌丝形态如图 6 所示。由 6a)和 b)可知,对于球毛壳菌 CGMCC 6882,培养至第 1 d,菌丝开始覆盖培养基并向四周蔓延生长,能明显观察到菌丝形态;培养至第 4 d,菌落直径为(434.35±

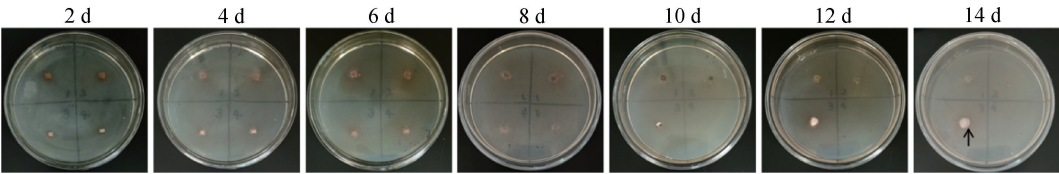


图 4 转化菌株筛选结果
Fig. 4 Screening of transformation strains

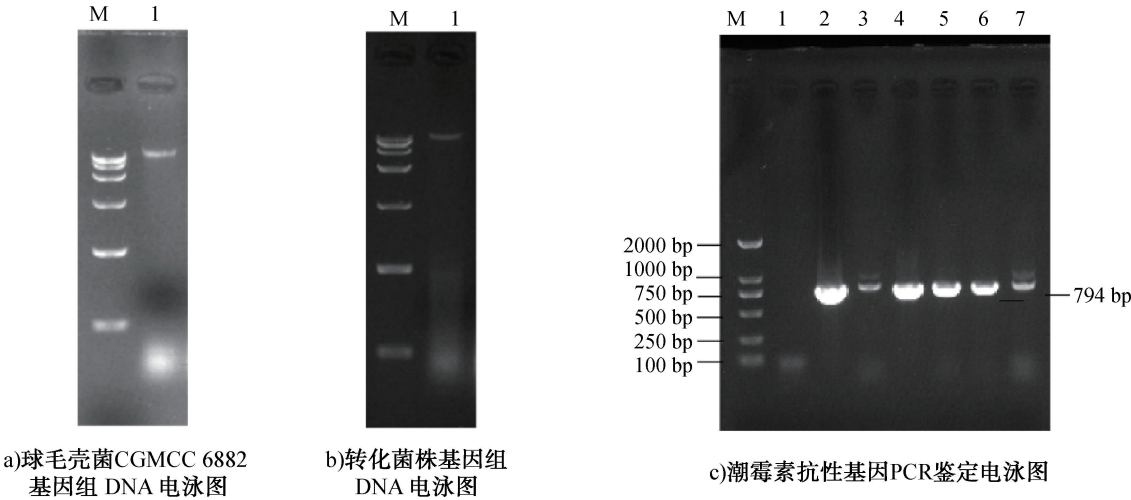


图 5 转化菌株分子鉴定结果
Fig. 5 Molecular identification of transformed strains

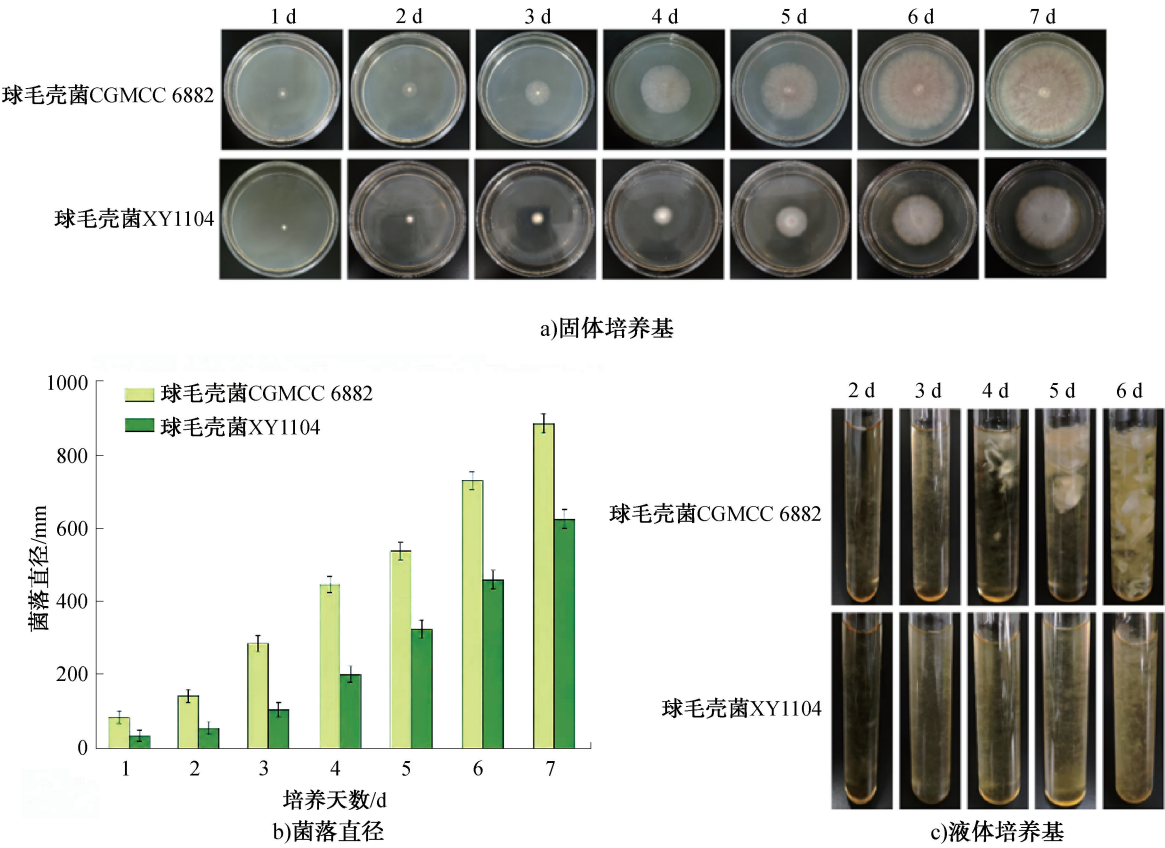


图 6 菌落直径及菌丝形态

Fig. 6 Colony diameter and mycelial morphology

10.03) mm; 培养至第 7 d, 菌落完全覆盖培养基, 菌落直径为 (854.59±11.62) mm, 且四周菌丝有一定厚度。对于球毛壳菌 XY1104, 培养至第 1 d, 无法测定菌落直径及观察菌丝形态; 培养至第 4 d, 菌落直径仅 (201.89±9.35) mm, 低于同期球毛壳菌 CGMCC 6882 直径的一半, 且菌株整体紧贴培养基生长, 无法观察到菌丝形态; 培养至第 7 d, 菌落约覆盖平板 60%, 菌落直径为 (620.71±13.61) mm, 无法观察菌丝形态, 菌株厚度未增加。这表明在固体培养基中, 球毛壳菌 XY1104 生长速率低于球毛壳菌 CGMCC 6882。由图 6c) 可知, 二者在液体培养基中的生长差异同样明显。培养至第 2 d, 球毛壳菌 CGMCC 6882 出现细小菌落, 球毛壳菌 XY1104 未出现明显菌落; 培养至第 4 d, 球毛壳菌 CGMCC 6882 菌丝缠绕成较大面积菌块及菌球, 球毛壳菌 XY1104 虽密集生长, 但菌丝呈细小短杆状, 几乎未发生缠绕; 培养至第 6 d, 球毛壳菌 CGMCC 6882 无独立菌丝出现, 菌落形成的菌球呈“鸡蛋花”缠绕形态, 而球毛壳菌 XY1104 菌落仍大量生长, 菌丝细小且密集生

长, 未发生大面积缠绕。这表明 *Y1Ste20* 基因对球毛壳菌 CGMCC 6882 菌丝生长、形态和生长速率均有一定的调控作用。

已有研究证实, *Ste20* 激酶基因与真菌菌丝生长密切相关。D. Li 等^[19] 在敲除黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 中 *Ste20* 激酶基因后, 观察到菌丝变短。P. Wang 等^[20] 在敲除新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 和担子菌酵母 (*Basidiomycete yeast*) 中 *Ste20* 激酶基因后, 同样观察到二者菌丝均缩短。本研究中, 敲除 *Ste20* 激酶同源基因 (*Y1Ste20* 基因) 的球毛壳菌 XY1104 出现菌丝细小、生长缓慢、无明显缠绕的表型, 与上述文献中报道的 *Ste20* 激酶基因敲除后菌丝生长受抑制的结果较一致, 进一步证明 *Ste20* 激酶基因在真菌菌丝生长调控中的功能。

3 结论

本研究通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建了解脂耶氏酵母 *Ste20* 激酶同源基因 (*Y1Ste20* 基因) 敲除重组质粒 pFC332-5S rRNA-*Ste20* gRNA, 并

将其导入球毛壳菌 CGMCC 6882 原生质体,获得转化菌株球毛壳菌 XY1104,其菌丝细小且密集生长,未发生大面积缠绕,而原始菌株球毛壳菌 CGMCC 6882 的菌丝密集生长且缠绕,这证实 *Ste20* 激酶基因在调控球毛壳菌菌丝形态中发挥关键作用,并为后续优化胞外发酵工艺提供了重要的菌株材料。该研究结果不仅为球毛壳菌的分子育种奠定了基础,也为其他丝状真菌的形态调控研究提供了参考。尽管本研究已对 *YISte20* 基因敲除菌株进行了分子鉴定和定性表型分析,但仍存在以下不足:液体培养基中菌丝缠绕仅为定性描述,缺乏定量数据支撑,后续应采用图像分析软件测定菌丝形态,或通过测定发酵液黏度变化进行定量分析;*YISte20* 基因敲除对发酵效果的影响尚未验证,后续应比较野生型与 *YISte20* 基因敲除菌株在发酵过程中的差别,以明确较短菌丝形态对发酵性能的贡献。此外,*YISte20* 基因调控菌丝形态的分子机制仍需进一步解析。

参考文献:

- [1] Li Q, Zhang C, Zhou J, et al. Morphological regulation of filamentous fungi improves industrial production[J]. *Biotechnology Advances*, 2026, 87: 108793.
- [2] Xu M M, Ming S, Cui J H, et al. Harnessing *Mycelium*-based morphology of filamentous fungi in food biomanufacturing: integrated advances, challenges, and future perspectives[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2026, 172: 105696.
- [3] Li Y F, Chen F, Liu X Z. Effects of *Rosa roxburghii* tramat on the growth, nutrient composition, and antioxidant activity of *Pleurotus ostreatus* mycelia[J]. *Molecules*, 2022, 27(11): 3585.
- [4] Jiang L H, Li X F, Zan X Y, et al. The β -1,3-glucan synthase gene GFGLS2 plays major roles in mycelial growth and polysaccharide synthesis in *Grifola frondosa* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(2): 563–578.
- [5] Zhou Y S, Duan Y, Chen L M, et al. Engineering dispersed mycelium morphology in *Aspergillus niger* for enhanced mycoprotein production via CRISPR/Cas9-mediated genome editing[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 432: 132652.
- [6] Yu L Y, Wang T T, Wang B, et al. The mechanism of short hypha formation and high protein production system mediated by cell wall integrity signaling pathway in *Aspergillus niger* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 283: 137413.
- [7] 韦涵文, 张莹, 林少园, 等. 禾谷炭疽菌 G 蛋白 α 亚基 CgrGa3 调控营养生长、胁迫响应、孢子产生和致病性[J]. *微生物学通报*, 2025, 52(4): 1462–1474.
- Wei H W, Zhang Y, Lin S Y, et al. G protein α subunit CgrGa3 regulates vegetative growth, stress responses, conidial production, and pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* [J]. *Microbiology China*, 2025, 52(4): 1462–1474.
- [8] Vandermeulen M D, Cullen P J. Ecological inducers of the yeast filamentous growth pathway reveal environment-dependent roles for pathway components[J]. *MSphere*, 2023, 8(5): e00284–e00223.
- [9] González B, Mirzaei M, Basu S, et al. Turnover and bypass of p21-activated kinase during Cdc42-dependent MAPK signaling in yeast[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(11): 105297.
- [10] Zhong C R, Guan S Y, Xu M, et al. An extremely poor nutritional condition enables efficient white cell mating in *Candida albicans* [J]. *mSphere*, 2025, 10(6): e0029125.
- [11] 黄淑婷, 孙娅西, 宦海琳, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的植物乳植杆菌 YZH81 胞外多糖合成基因簇功能鉴定[J]. *食品科学*, 2025, 46(6): 133–141.
- Huang S T, Sun Y X, Huan H L, et al. Functional characterization of the exopolysaccharide gene clusters of *Lactiplantibacillus plantarum* YZH81 using CRISPR/Cas9 technology[J]. *Food Science*, 2025, 46(6): 133–141.
- [12] Biswas S, Wahl N J, Thomson M J, et al. Optimization of protoplast isolation and transformation for a pilot study of genome editing in peanut by targeting the allergen gene *Ara h 2* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 837.
- [13] Amalamol D, Ashwin N M R, Lakshana K V, et al. A highly efficient stratagem for protoplast isolation and genetic transformation in filamentous fungus *Colletotrichum falcatum* [J]. *Folia Microbiologica*, 2022, 67(3): 479–490.
- [14] 黎伟梦, 赖炜利, 沈洁旋, 等. 高州油茶叶肉原生质体分离与瞬时转化体系的建立[J/OL]. *广西科学*, <https://doi.org/10.13656/j.cnki.gxkx.20251224.002>.
- Li M W, Lai Y L, Shen J X, et al. Development of an efficient mesophyll protoplast isolation and transient transformation system in *Camellia drupifera* [J/OL]. *Guangxi Science*, <https://doi.org/10.13656/j.cnki.gxkx.20251224.002>.
- [15] 王晶晶, 董晓宇. 基于 Cre/loxP 系统构建酿酒酵母 YVC1 基因缺失菌株[J]. *生物学杂志*, 2025, 42(5): 60–66.
- Wang J J, Dong X Y. Construction of YVC1 gene deleted *Saccharomyces cerevisiae* based on Cre/loxP system[J]. *Journal of Biology*, 2025, 42(5): 60–66.
- [16] Jiang C, Zou D, Jiang X D, et al. Enhancement of green production of heme by deleting odor-related genes from *Bacillus amyloliquefaciens* based on CRISPR/Cas9n[J].

Journal of Agricultural and Food Chemistry,2024,72(29)
16412–16422.

[17] Liu S X, Xiao F X, Li Y R, et al. Establishment of the CRISPR-Cpf1 gene editing system in *Bacillus licheniformis* and multiplexed gene knockout [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2025, 10(1):39–48.

[18] 席凯飞,李成杰,丁艺,等. 利用非同源末端连接缺陷构建拟轮枝镰孢菌的高效基因敲除方法[J]. 生物技术进展,2024,14(3):422–432.

Xi K F, Li C J, Ding Y, et al. Highly efficient gene knock-

out method in *Fusarium verticillioides* using nonhomologous end-joining deficiency [J]. Current Biotechnology, 2024, 14(3):422–432.

[19] Li D, Qin L, Wang Y C, et al. AflSte20 regulates morphogenesis, stress response, and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* [J]. Toxins, 2019, 11(12):730.

[20] Wang P, Nichols C B, Lengeler K B, et al. Mating-type-specific and nonspecific PAK kinases play shared and divergent roles in *Cryptococcus neoformans* [J]. Eukaryotic Cell, 2002, 1(2):257–272.

Construction of the *YlSte20* gene knockout recombinant plasmid in *Chaetomium globosum* CGMCC 6882 and analysis of its effects on mycelial morphology

Shi Yixin, Zhou Xueyan, Wang Qi, Wang Zichao

School of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

Abstract:【Objective】This study aimed to investigate the regulatory role of the Ste20 kinase homolog gene from *Yarrowia lipolytica* (*YlSte20*) in *Chaetomium globosum* CGMCC 6882 after targeted gene knockout, with particular focus on its effects on colony diameter and hyphal morphology. 【Methods】A *YlSte20* gene knockout recombinant plasmid was constructed using CRISPR-Cas9 gene editing technology. The recombinant plasmid was introduced into *C. globosum* CGMCC 6882 protoplasts via PEG-mediated protoplast transformation to obtain the *YlSte20* gene knockout strain *C. globosum* XY1104, and its colony growth characteristics and hyphal morphology were analyzed. 【Results】The *YlSte20* gene knockout recombinant plasmid (pFC332-5S rRNA-Ste20 gRNA) was constructed using CRISPR-Cas9 gene editing technology and successfully transferred into *C. globosum* CGMCC 6882 protoplasts, yielding the *YlSte20* gene knockout strain *C. globosum* XY1104. On solid medium, the colony diameter of strain XY1104 was (201.89 ± 9.35) mm, which was smaller than that of *C. globosum* CGMCC 6882 ((434.35 ± 10.03) mm). In liquid culture, strain XY1104 exhibited fine, short, rod-like hyphae without entanglement, whereas *C. globosum* CGMCC 6882 lacked discrete hyphae and readily formed mycelial pellets. 【Conclusion】Disruption of the *YlSte20* gene led to a reduced colony diameter and hyphae that were fine, short, and rod-like, grew densely, and showed reduced entanglement in *C. globosum* CGMCC 6882. These findings indicate that *YlSte20* is involved in regulating hyphal growth and morphogenesis in *C. globosum* CGMCC 6882.

Key words: *Chaetomium globosum* CGMCC 6882; *YlSte20* gene; gene knockout recombinant plasmid; mycelial morphology

[责任编辑:杨晓娟]