



腺苷酸核糖基化因子 BbarfA 介导白僵菌孢子萌发和毒力

刘海^{1#}, 赵婧^{1,2#}, 李雪兵¹, 刘鹏飞¹, 罗廷英², 张永军^{1,2*}

¹西南大学生物技术中心, 重庆 400715

²西南大学植物保护学院, 重庆 400715

摘要:【目的】探究腺苷酸核糖基化因子 ARF 在球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中存在种类及生物学功能。【方法】利用 BLASTp 搜索球孢白僵菌非冗余蛋白数据库, 鉴定 ARF 并进行聚类分析, 结合表达分析、反义抑制、超量表达野生型基因和 GTP 解离位点与结合位点突变的基因, 解析其中 1 个 ARF 与白僵菌发育分化、逆境胁迫反应和毒力的关系。【结果】球孢白僵菌中存在至少 6 个 ARF 或类似蛋白, 分别聚属于酵母、人类 ARF 及其类似蛋白的不同类群。其中 BBA_01574 与人类的 ARF3、ARF4 和 ARF5 聚为一类, 命名为 BbarfA。BbarfA 在成熟的分生孢子和球形膨大时期表达明显高于芽管伸长期。反义抑制 BbarfA 加速了孢子萌发, 提高了菌株毒力, 而超量表达 BbarfA 和点突变 GTP 解离区域的 BbarfA 则延迟了孢子萌发速度, 降低了菌株毒力。尽管 BbarfA 转录受高盐、高渗、氧化和高温胁迫的诱导, 但遗传修饰的转化子与野生菌株对上述胁迫反应的敏感性无明显差异。【结论】BbarfA 介导分生孢子萌发和毒力。

关键词: 腺苷酸核糖基化因子, 球孢白僵菌, 孢子萌发, 毒力

腺苷酸核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARFs) 属于小 G 蛋白 (GTP-binding proteins) 超家族中的 ARF 亚族, 分子量约为 21 kDa, 在真核生物中普遍存在并高度保守^[1], 调节囊泡运输、磷脂代谢、细胞骨架重构等生物学过程^[2]。ARFs 是一个多基因家族, 根据氨基酸序列相似性可将其分为 3 个类别 (Class)。在哺乳动物中至少有 6

个 ARF 蛋白, 其中 ARF1、ARF2 和 ARF3 聚为类别 I (Class I), ARF4 和 ARF5 聚为类别 II (Class II), ARF6 则单独聚为类别 III (Class III)^[3-4]。人类 Class I ARFs (ARF1 和 ARF3) 定位于高尔基体复合体。ARF1 和 ARF3 的相似性大于 96%, 均是该家族中高丰度表达的蛋白。Class II ARFs (ARF4 和 ARF5) 是低丰度表达蛋白, 但在早期分泌途径中对于维

基金项目: 国家自然科学基金(30871668)

*通信作者。Tel: +86-23-68250042; Fax: +86-23-68251883; E-mail: yjzhang@swu.edu.cn

#并列第一作者。

收稿日期: 2016-12-23; 修回日期: 2017-03-06; 网络出版日期: 2017-05-11

持高尔基体结构和参与膜运输等生物学过程至关重要^[5]。相反, Class III ARFs (ARF6)则定位于细胞膜,调控内吞作用、肌动蛋白和质膜重构^[6]。在真菌酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中仅存在2个 Class I ARF 蛋白(ARF1 和 ARF2)和一个 Class III 蛋白(ARF3),但缺少 Class II ARF 蛋白^[3]。另外,真核细胞中也存在多种 ARF 类似蛋白(ARF-like, 简称为 ARL 或 ARFL),与高尔基体复合物相关^[7]。

ARFs 的调控机制与异源三聚体 G 蛋白不同,其“分子开关”作用的发挥依赖于与其关联的蛋白鸟苷酸交换因子 GEFs (guanine-nucleotide-exchange factors)和 GTP 酶激活蛋白 GAPs (GTPase-activating proteins)。GEFs 催化 ARF 转换为 GTP 的结合形式,激活 ARFs。处于激活状态的 ARFs 通过和不同效应分子相互作用,行使不同的细胞和生理功能。GAPs 通过启动水解 GTP 活性,将 ARFs-GTP 活性状态关闭,转换为非活性状态的 ARFs-GDP^[8]。ARFs-GTP 结合蛋白通过向细胞膜表面补充外壳蛋白和肌动蛋白及改变膜脂成分等,调节囊泡运输和细胞结构^[9]。ARFs 与构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和酿酒酵母等多种真菌的菌丝极性生长、孢子萌发极性的建立与维持、囊泡的运输等密切相关^[10]。另外研究还发现,ARFs 对于一些真菌的正常存活是必需的^[10]。

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)是一种国内外广泛用于农、林及卫生害虫生物防治的昆虫病原真菌,但 ARFs 及类似蛋白在白僵菌的存在数量、分类及生物学功能尚不明确。本研究以酵母 AFR1、AFR2、AFR3 和 ARL 氨基酸序列为探针,利用 BLASTp 搜索球孢白僵菌非冗余蛋白数据库,发现至少存在6个 ARF 或 ARL 因子,分别为 BBA_02249、BBA_03298、BBA_04097、BBA_00918、

BBA_07587 和 BBA_01574。系统聚类分析发现,BBA_01574 独立于酵母 ARFs,与人类的 ARF3、ARF4 和 ARF5 聚为一类,命名为 BbarfA。通过表达特性分析、反义抑制、过表达野生型基因、GTP 结合位点或解离位点突变的基因,研究 BbarfA 与病原菌发育分化和侵染致病的关系,为揭示 ARFs 在昆虫病原真菌参与的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

球孢白僵菌(*B. bassiana*) Bb0062 (CGMCC 7.34),用于遗传转化的真菌亲本菌株;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α ,用于载体构建。上述菌株均保存于本实验室。

pUCm-T 载体为 Bio Basic Inc.公司产品,用于基因 A-T 克隆。pBARGPE1 为真菌超量表达载体,保存于本实验室。

1.2 球孢白僵菌 ARF(L)s 系统聚类及序列分析

以酿酒酵母 ARF1 (AAA34431)、ARF2 (AAA34430)、ARF3 (AAA61614)和 ARLs (EGA83976、EGA 59715、AAC49875、EGA 79914、AAD13357 和 AAD56735)氨基酸序列为探针,利用 BLASTp (protein-protein BLAST)搜索球孢白僵菌非冗余蛋白数据库(database of non-redundant protein sequences)。采用 MEGA 6 软件及最大似然率法(Maximum-Likelihood method)进行 ARFs 的系统进化分析。

1.3 BbarfA::eGFP 基因融合、载体构建及遗传转化

以球孢白僵菌基因组 DNA 为模板,利用引物 Bbarf1egfp-F/Bbarf1egfp-R 扩增 BbarfA 启动子区域和编码区(删除终止密码子 TAG)(2417 bp),并在

5'-端引入 *Nde* I 酶切位点, 3'-端引入 3 个三氨基酸 (ARA) 的铰链区(GCCCGAGCC)。以质粒 eGFP-C1 (Becton Dickinson, Molecular Biology Products) 为模板, 利用引物 eGFP-F/eGFP-R 扩增 eGFP 片段 (723 bp), 并在 3'-端引入 *Bgl* II 酶切位点。回收两扩增片段后通过无引物重叠 PCR 扩增融合, 然后利用引物 Bbarf1egfp-F/eGFP-R 扩增融合片段。将融合片段 AT 克隆到 pUCm-T 载体进行测序验证。利用 *Nde* I 和 *Bgl* II 酶切融合片段, 克隆到 pBARGPE1 的 *Nde* I 和 *Bam*H I 位点, 置换 *gpdA* 启动子区域。采用高频电流介导分生孢子遗传转化方法^[11]将获得载体导入球孢白僵菌。引物序列见表 1。

1.4 RNA 提取和 Real-time RT-PCR 分析

利用 Qiagen RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒提取真菌总 RNA。取 2 µg 总 RNA, 采用 Oligo (dT)

引物合成 cDNA 第一链, 具体操作参照 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (MBI) 反转录试剂盒说明书。以 cDNA 第一链为模板, 采用 Real-time RT-PCR 试剂盒 (iQTM SYBR Green Supermix, Bio-Rad 公司) 进行基因表达分析。以 *actin* (GenBank ID: HQ232398) 和 *β-tubulin* (GenBank ID: DQ079603) 作为参比基因归一化 (normalize) 靶标基因相对表达水平, 具体计算采用 CFX Manager software (Bio-Rad)。引物序列见表 1。

BbarfA 在分生孢子萌发不同时期的表达分析: 配制分生孢子悬浮液, 接种于 1/4SDY 液体培养基至孢子终浓度为 1×10^7 conidia/mL, 于 26 °C、180 r/min 摇瓶培养 0、4、8、12、16、20 h。离心收集不同时期的分生孢子培养物, 提取总 RNA, 反转录后利用引物 arfaRT-F/arfaRT-R (表 1) 和 Real-time RT-PCR 分析 *BbarfA* 表达特性。

表 1. 本研究所用引物
Table 1. Primers list in this study

Primers	Sequence (5'→3')*
Bbarf1egfp-F	<u>GGAATTCCATATG</u> CGGAGAGGAAATGCATAATC
Bbarf1egfp-R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGCCCGAGCCCTGATGGCCAGCCTTGCGGA
eGFP-F	GGCTCGGGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
eGFP-R	<u>GGAAGATCTTC</u> CTATTACTTGTACAGCTCGT
BbarfA-FP	GGGAAGATCCTGCTTGTTG
BbarfA- BP	ATGTTCTTGACTCGACGGATATCCCTAC
BbarfA-F	<u>CGGGATCCCGCAATCAT</u> GGGTCTCGCTT
BbarfA- R	<u>TCCCCCGGGT</u> TCTTCTACTGATGGCCAG
BbarfA-mR	GCGGCGCCGAGACCGACCAT
BbarfA- mF	ATGGTCGGTCTCGGCGCCGC
BbarfA-QIR	TCTTGTCGATACCAACGACA
BbarfA- QIF	TGTCGGTGGTATCGACAAGA
β-Tubulin-1	TACTCTACGATTCGTCAAGT
β-Tubulin-2	TGCTGGAACAGAGCCGTCTT
actin-F	TTGGTGCGAACTTCAGCGTCTAGTC
actin-R	TCCAGCAAATGTGGATCTCCAAGCAG
arfaRT-F	AGCGCATGCTCAACGAGGA
arfaRT- R	TGATGGCCAGCCTTGCGGA

*: The introduced enzyme sites are underlined.

BbarfA 在不同胁迫条件下的表达分析: 收集在 1/4SDY 液体培养基于 26 °C、180 r/min 摇瓶培养 72 h 的野生菌株菌体, 用灭菌水清洗后分别接种于 Czapek Broth (CZB)、含 0.8 mol/L NaCl、1.0 mol/L sorbitol 或 4.6 mmol/L H₂O₂ 的 CZB, 于 26 °C 或 32 °C (高温)、180 r/min 摇瓶培养 12 h 后收集菌丝, 提取总 RNA, 反转录后利用 Real-time RT-PCR 分析 *BbarfA* 表达特性。

转化子中 *BbarfA* 表达分析: 收集在 1/4SDY 液体培养基中于 26 °C、180 r/min 培养 48 h 的菌体, 用灭菌水洗涤后接种于 CZB 中, 于 26 °C、180 r/min 摇瓶培养 24 h 后收集菌体, 提取总 RNA, 反转录后利用 Real-time RT-PCR 分析 *BbarfA* 表达水平。

1.5 *BbarfA* ihpRNA 及超量表达 *BbarfA* 载体构建及遗传转化

根据 Xiao et al. 的方法^[12], 设计引物 BbarfA-FP/BbarfA-BP (表 1), 以球孢白僵菌基因组 DNA 为模板, 直接扩增 *BbarfA* 中含内含子的发夹结构 RNA (Intron-containing hairpin RNA, ihpRNA)。将扩增的 *BbarfA* ihpRNA (602 bp) 克隆到 pUCm-T 载体上测序验证, 然后用 *EcoR* I/*Xho* I 酶切回收测序正确的 *BbarfA* ihpRNA, 将其克隆到 pBARGPE1 载体的相同酶切位点, 置于真菌基因组启动子 *PgadA* 之下, 形成 pBARGPE1-BbarfA-ihpRNA 载体。采用高频电流介导分生孢子的遗传转化方法^[11]将获得的载体导入球孢白僵菌。

以球孢白僵菌基因组 DNA 为模板, 用引物 BbarfA-F/BbarfA-R (表 1) 扩增 *BbarfA* 编码区, 约 820 bp。扩增产物用 *Bam*H I/*Sma* I 酶切后连接于 *Bam*H I/*Eco*R V 酶切的 pBARGPE1 上, 将其置于真菌基因组启动子 *PgadA* 之下, 形成超量表达 *BbarfA* 载体 pBARGPE-arfA (图 1-A), 采用高

频电流介导分生孢子遗传转化方法^[11]导入球孢白僵菌。

1.6 超量表达 GTP 解离位点或结合位点突变基因的载体构建及遗传转化

设计引物引入突变位点, 采用重叠 PCR 分别扩增获得 GTP 解离位点和结合位点突变的 *BbarfA*^{D26G} 和 *BbarfA*^{Q71I} 片段。具体操作如下: 以球孢白僵菌基因组 DNA 为模板, 利用引物 BbarfA-F/BbarfA-mR 和 BbarfA-mF/BbarfA-R 分别扩增 GTP 解离位点突变的 *BbarfA* 5'-端片段 (83 bp) 和 3'-端片段 (约 739 bp), 回收两扩增片段后通过无引物重叠 PCR 扩增融合, 然后利用引物 BbarfA-F/BbarfA-R 扩增 GTP 解离位点突变的 *BbarfA* 片段 *BbarfA*^{D26G} (820 bp)。将扩增片段 AT 克隆到 pUCm-T 后测序验证 (图 1-B)。利用引物 BbarfA-F/BbarfA-QIR 和 BbarfA-QIF/BbarfA-R 分别扩增 GTP 结合位点突变的 *BbarfA* 5'-端片段 (310 bp) 和 3'-端片段 (510 bp)。回收两扩增片段后通过无引物重叠 PCR 扩增融合, 然后利用引物 BbarfA-F/BbarfA-R 扩增 GTP 结合位点突变的 *BbarfA* 片段 *BbarfA*^{Q71I} (820 bp), 将扩增片段 AT 克隆到 pUCm-T 后测序验证 (图 1-B)。利用 *Bam*H I/*Sma* I 分别酶切测序正确的 *BbarfA*^{D26G} 和 *BbarfA*^{Q71I}, 将其克隆到 pBARGPE1 的 *Bam*H I/*Eco*R V 位点, 置于真菌基因组启动子 *PgadA* 之下, 形成 pBARGPE1-arfA^{D26G} 和 pBARGPE1-arfA^{Q71I} (图 1-A), 然后通过高频电流介导分生孢子遗传转化方法^[11]将获得载体导入球孢白僵菌。引物序列参见表 1。

1.7 分生孢子萌发测定

将新鲜培养的分生孢子配成浓度为 3×10⁷ conidia/mL 的孢子悬浮液, 取 100 μL 接种于 Czapek 平板上, 涂布均匀。于 26 °C 恒温培养,

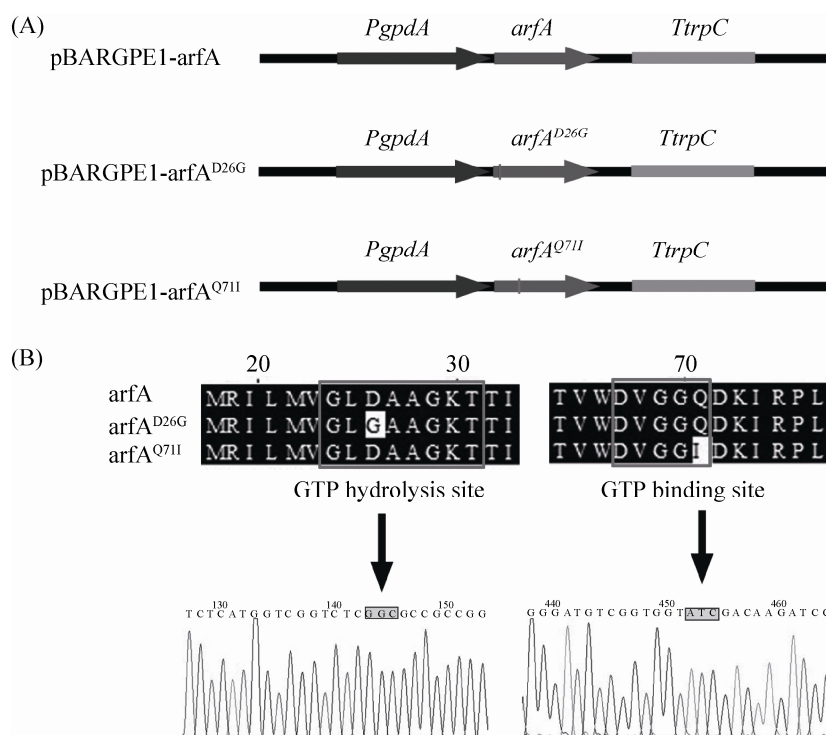


图 1. 超量表达野生型及活性位点突变的 *BbarfA* 载体(A)与测序验证引入的突变位点(B)

Figure 1. Diagram of *BbarfA* expression vectors and sequence verification of the introduced mutation sites in *BbarfA*. A: construction of vectors overexpressing *BbarfA* (pBARGPE1-*arfA*), *BbarfA*^{D26G} (pBARGPE1-*arfA*^{D26G}) and *BbarfA*^{Q71I} (pBARGPE1-*arfA*^{Q71I}); B: designed mutation sites in *BbarfA* and verification of the introduced mutation sites by DNA sequencing.

从 9 h 开始每间隔 1 h 取样, 用显微镜观察并统计孢子萌发率。每个视野统计孢子数目不少于 100 个, 重复 3 次。芽管大于孢子的宽度视为萌发。

1.8 生物测定

以三龄大蜡螟幼虫 (*Galleria mellonella*) 为试虫, 采用两种接种方式进行生物测定。一种是体壁侵染接种, 即将试虫浸于浓度为 2×10^7 conidia/mL 的分生孢子悬浮液中 20 s, 然后用吸水纸吸去多余水分。另一种接种方式是微量注射法, 即将浓度为 1×10^7 conidia/mL 分生孢子悬浮液微量注射到幼虫血腔, 每头虫注射 2 μ L。两种接种方法均以 0.05% (*V/V*) Tween-80 进行相同处理的试虫为对照。接种后于 26 $^{\circ}$ C 保湿培养, 从 48 h 后每隔

12 h 统计死亡率。每处理为 30–40 头试虫, 实验重复 3 次。利用 Kaplan-Meyer 曲线绘制试虫存活率趋势, 并利用对数秩检验(log rank test)分析不同菌株处理与野生菌株处理的组间差异。利用 SPSS 8.0 软件计算不同处理的半致死时间(LT₅₀)。

2 结果和分析

2.1 BbarfA 序列分析

以酿酒酵母 ARF1、ARF2、ARF3 及其类似蛋白 ARL1 与 ARL3 氨基酸序列为探针, 利用 BLASTp 搜索球孢白僵菌非冗余蛋白数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein&term=txid655819%5BOrganism%5D&cmd=search>), 获得 6 个

ARF 及其类似蛋白, 分别为 BBA_01574、BBA_02249、BBA_03298、BBA_04097、BBA_00918 和 BBA_07587。系统聚类分析发现, BBA_02249 与酵母 ARF1 和 ARF2 聚为一类, BBA_03298 与酵母 ARF3 聚类一类, BBA_04097 与酵母 ARL1 聚为一类, 而 BBA_01574 则独立于酵母 ARFs, 与人类的 ARF3、ARF4 和 ARF5 聚为一类,

BBA_00918 和 BBA_07587 与人类的 ARL8A 聚为一类(图 2)。BBA_01574 编码 183 个氨基酸, 等电点为 6.77, 分子量约为 20.9 kDa, 将其命名为 BbarfA。序列分析发现, BbarfA 在第 24–31 位氨基酸含有保守的 GTP 解离区域 GLDAAGKT (GXXXXGKT), 第 67–71 位、126–129 位和 159–162 位含有保守的 GTP 结合区域 DVGGQ、NKQD 和 CAT^[13]。

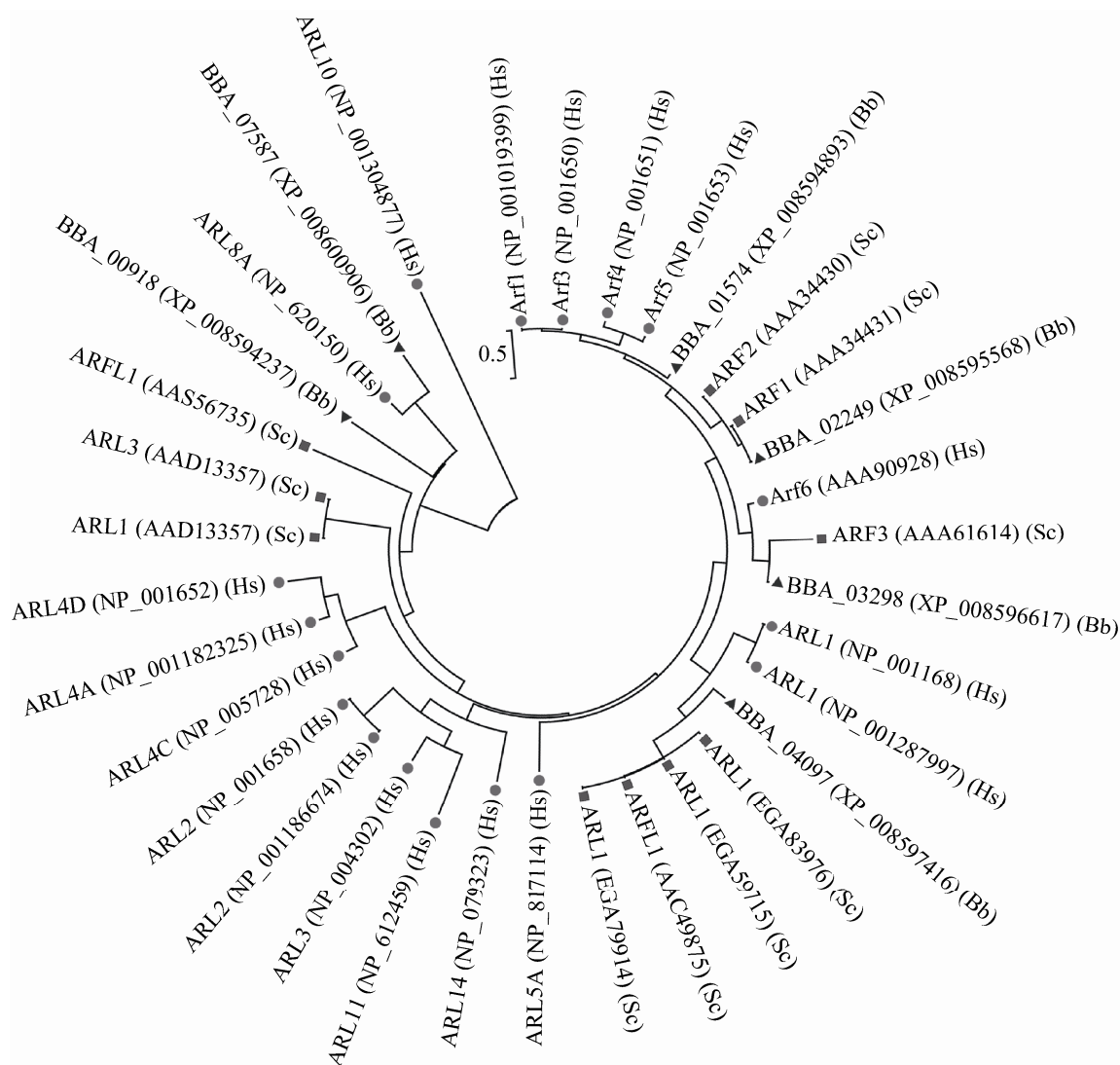


图 2. 球孢白僵菌及人类和酵母 ARFs 的分子系统发育分析

Figure 2. Molecular phylogenetic analysis of ARFs from *B. bassiana*, *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisia* using maximum-likelihood method. Evolutionary analysis was conducted in MEGA6. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. GenBank numbers is showed in the brackets followed the proteins. Bb, *Beauveria bassiana*; Sc, *Saccharomyces cerevisia*; Hs, *Homo sapiens*.

2.2 *BbarfA* 的表达特性

利用融合绿色荧光蛋白 eGFP 分析 *BbarfA* 在孢子发育过程中的表达特性, 结果表明 GFP 荧光在成熟的分生孢子和球形膨大时期(接种后 4 h)荧光较强, 而在芽管出现和伸长过程中, 荧光较弱且仅在孢子部位观察到荧光, 而在芽管未观察到明显荧光(接种后 8–20 h) (图 3-A)。Real-time RT-PCR 分析进一步证实了 *BbarfA* 在分生孢子萌发过程中的表达特征(图 3-B)。在高盐(0.8 mol/L NaCl)、高渗(1.0 mol/L sorbitol)、氧化(4.6 mmol/L H_2O_2)和高温胁迫(32 °C)条件下, *BbarfA* 的转录水平明显高于在正常条件下(Control) (图 3-C)。由此推测, *BbarfA* 可能与病原菌分生孢子的萌发以及逆境胁迫反应相关。

2.3 超量表达 *BbarfA* ihpRNA、*BbarfA*、*BbarfA*^{D26G} 和 *BbarfA*^{Q711} 的转化子筛选

分别用 *Sca* I 线性化表达载体 pBARGPE1-*BbarfA* ihpRNA、pBARGPE1-*arfA*、pBARGPE1-*arfA*^{D26G} 和 pBARGPE1-*arfA*^{Q711}, 采用高频电流介导分生孢子转化法导入球孢白僵菌, 在含 200 μg/mL 除草剂草甘膦(phosphinothricin)的 Czapek 平板上筛选抗性菌落。利用 PCR 扩增标记基因 *bar* 验证抗性菌落并筛选转化子(数据略)。转化子经连续继代培养 3 次后, 采用 Real-time RT-PCR 筛选反义抑制 *BbarfA* 和过表达野生型、GTP 解离位点和结合位点突变的 *BbarfA* 转化子。结果表明, *arfA*-ihpRNA 转化子中 *BbarfA* 转录水平下调 11%–67%, 但部分转化子表达水平高于野生菌株(图 4-A)。超量表达 *BbarfA* 转化子中基因表达水平上调 0.36–2.85 倍(图 4-B); 超量表达 *BbarfA*^{D26G} 转化子中导入基因上调 0.34–1.23 倍(图 4-C); 超量表达 *BbarfA*^{Q711} 转化子中导入基因上调 0.35–1.48 倍(图 4-D)。本研究选择

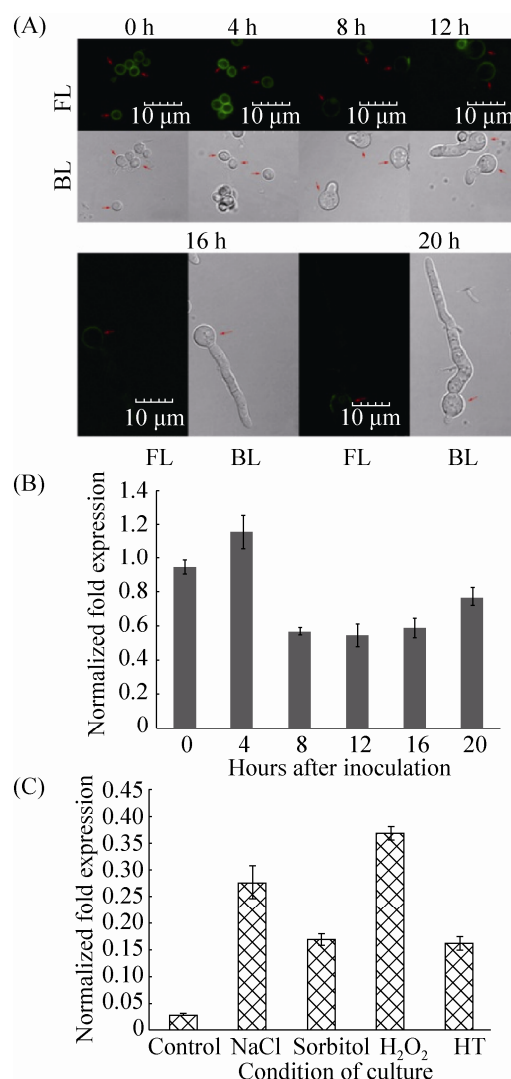


图 3. *BbarfA* 在分生孢子萌发过程和不同胁迫条件下的表达特性

Figure 3. Expression patterns of *BbarfA* during conidial germination, and under different stress conditions. A: GFP fluorescence of the transformants that harbored the fusion gene *BbarfA*::eGFP during conidial germination. FL, fluorescence light. BL, bright light. B and C: real-time RT-PCR analysis of *BbarfA* transcription patterns during conidial germination (B), and under different stress conditions (C). NaCl, Sorbitol and H_2O_2 , indicate cultures in CZB containing 0.8 mol/L NaCl, 1.0 mol/L sorbitol and 4.6 mmol/L H_2O_2 at 26 °C for 12 h, which represent high salt, osmotic and oxidative stresses, respectively. HT indicates cultures in CZB grown at 32 °C for 12 h, which represents high temperature stress. *actin* and β -*tubulin* were used as internal standard to normalize expression of *BbarfA*.

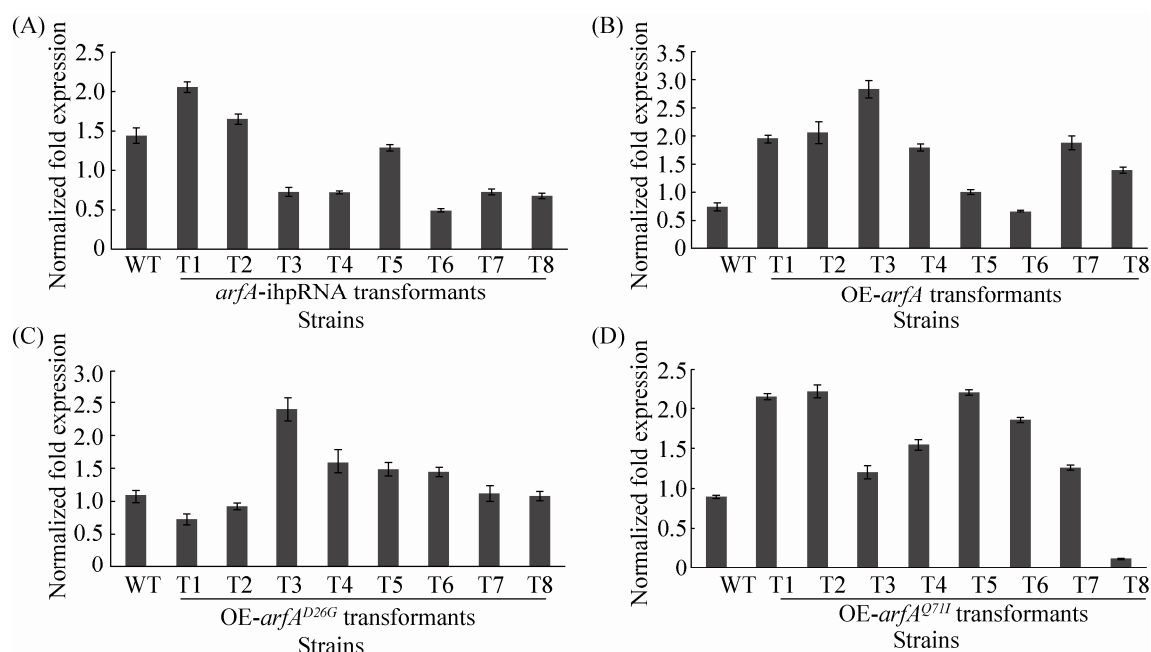


图 4. Real-time RT-PCR 分析转化子 *BbarfA* 的表达水平

Figure 4. Real-time RT-PCR analysis of *BbarfA* expression patterns in the transformants that overexpressed *BbarfA* ihpRNA (A), *BbarfA* (B), *BbarfA*^{D26G} (C) and *BbarfA*^{Q711} (D), respectively, as compared with the wild type strain (WT). Total RNAs were isolated from cultures of CZB at 180 r/min and 26 °C for 24 h and used for real-time RT-PCR analysis. *actin* and β -*Tubulin* were used as internal standard to normalize expression of *BbarfA*.

BbarfA 转录水平下调 67% 的 *arfA*-ihpRNA 转化子 T6、上调水平分别提高 2.85 倍、1.23 倍和 1.48 倍的超量表达 *BbarfA*、*BbarfA*^{D26G} 和 *BbarfA*^{Q711} 转化子 (T3、T3 和 T2) 进行后续研究。

2.4 *BbarfA* 介导球孢白僵菌分生孢子萌发

反义抑制和超量表达 *BbarfA*、*BbarfA*^{D26G} 和 *BbarfA*^{Q711} 对球孢白僵菌生长和产孢无明显影响，但反义抑制 *BbarfA* (*arfA*-ihpRNA) 加快了孢子萌发速率，而超量表达 *BbarfA* (OE-*arfA*) 和 *BbarfA*^{Q711} (OE-*arfA*^{Q711}) 则延迟了孢子萌发 (图 5)。不同菌株在 CZP [添加 0.5% (W/V) 蛋白胨的 Czapek agar] 培养基上的孢子萌发趋势和状态如图 5-A 和图 5-B 所示。接种 10 h 后，野生菌株萌发率约 42%，*arfA*-ihpRNA 菌株的萌发率则达到 64%，而 OE-*arfA* 和 OE-*arfA*^{Q711} 菌株的萌发率分别为 31%

和 33%。培养 12 h 后，野生菌株 (WT)、*arfA*-ihpRNA、OE-*arfA* 和 OE-*arfA*^{Q711} 菌株萌发率分别为 82%、93%、60% 和 72%。萌发中时 (GT₅₀) 计算结果显示，*arfA*-ihpRNA 的 GT₅₀ (9.32 h) 比野生菌株 (GT₅₀=10.23 h) 缩短了 8.9%，而 OE-*arfA* (11.25 h) 和 OE-*arfA*^{Q711} (10.74 h) 菌株的 GT₅₀ 分别比野生菌株延长了 10% 和 5%。OE-*arfA*^{D26G} 菌株分生孢子萌发率与野生菌株无明显差异。由此表明，*BbarfA* 是介导球孢白僵菌分生孢子萌发的重要因子。

2.5 *BbarfA* 负向调控球孢白僵菌毒力

以三龄大蜡螟幼虫为试虫，利用体壁接种和微量注射分生孢子两种方式进行生物测定。利用 Kaplan-Meier 曲线绘制试虫存活率趋势，并利用对数秩检验 (log rank test) 分析不同菌株处理与野生菌株处理的组间差异。结果表明，体壁接种后，

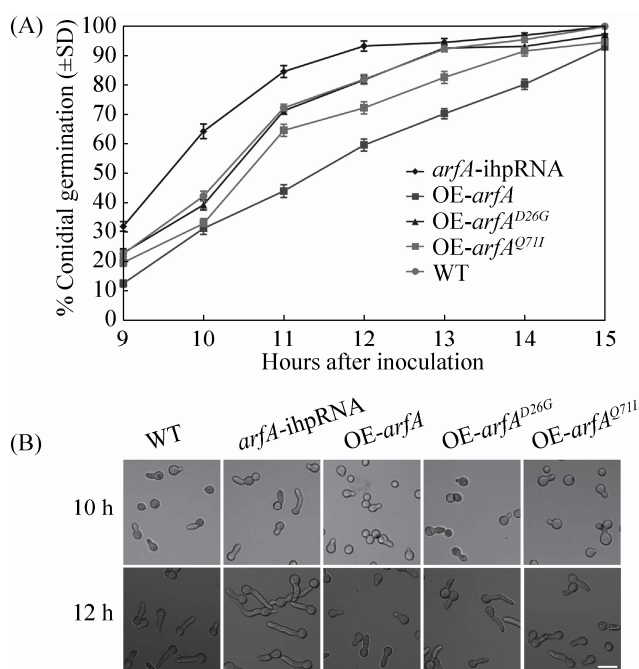


图 5. 分生孢子的萌发趋势

Figure 5. Determination of conidial germination. A: trends of conidial germination. Conidia were inoculated onto CZP plates [Czapek agar containing 0.5% (W/V) peptone], and germinated conidia were counted hourly beginning 9 h after inoculation. B: conidial germination of the test fungal strains at 10 h and 12 h after inoculation. Bar=10 μ m. WT, wild type strain. *arfA-ihpRNA*, *OE-arfA*, *OE-arfA^{D26G}* and *OE-arfA^{Q711}* indicate the strains that overexpressed *BbarfA* ihpRNA, *BbarfA*, *BbarfA^{D26G}* and *BbarfA^{Q711}*, respectively.

下调 *BbarfA* (*arfA-ihpRNA*)显著提高了菌株毒力 ($P<0.01$)(图 6-A), 半致死时间($LT_{50}=79.5$ h)比野生菌株(96.6 h)缩短了 17.7%, 而超量表达 *BbarfA* 和 *BbarfA^{Q711}* 则显著降低了菌株毒力($P<0.01$) (图 6-A), LT_{50} 分别为 108.2 h 和 100.1 h, 比野生菌株延长了 12.0%和 3.6%。而超量表达 *BbarfA^{D26G}* 菌株与野生菌株的毒力无明显差异($P>0.05$, 图 6-A)。微量注射接种后, 超量表达 *arfA-ihpRNA* 显著提高了菌株毒力($P<0.01$), 而超量表达 *BbarfA* 和

BbarfA^{Q711} 则降低了菌株毒力($P<0.01$ 和 $P<0.05$, 图 6-B), LT_{50} 分别为 75.4 h 和 69.4 h, 比野生菌株 (66.5 h)延长了 13.4%和 4.4%。超量表达 *BbarfA^{D26G}* 菌株的毒力与野生菌株无明显差异($P>0.05$, 图 6-B)。由此表明, *BbarfA* 负向调控球孢白僵菌毒力。

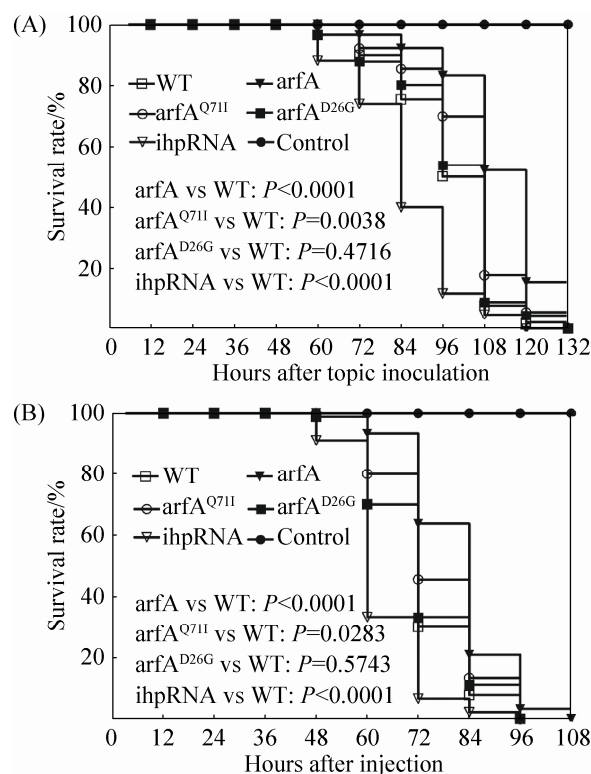


图 6. 体壁接种和微量注射接种三龄大蜡螟幼虫后的存活率趋势

Figure 6. Survival of *G. mellonella* larvae after infection with the wild type strain (WT), and the transformants that overexpressed *BbarfA* ihpRNA (*ihpRNA*), *BbarfA* (*arfA*), *BbarfA^{D26G}* (*arfA^{D26G}*) and *BbarfA^{Q711}* (*arfA^{Q711}*), respectively. A: survival of *G. mellonella* larvae following topical application with 2×10^7 conidia/mL suspensions of the test strains [control insects were dipped in 0.05% (V/V) Tween-80]. B: survival of *G. mellonella* larvae following injection into the second proleg with 2 μ L of 1×10^7 conidia/mL suspensions [control insects were injected with 2 μ L 0.05% (V/V) Tween-80].

3 讨论

小 G 蛋白 ARFs 是一类重要的调控蛋白, 主要定位于膜结构, 通过 GTP 依赖的方式招募效应分子, 参与多种生物学过程^[14]。ARFs 在 GTP 结合的活性状态和 GDP 结合的非活性状态循环。在活性状态下, ARFs 能够招募一系列的效应分子, 参与调控不同的生物学过程。GTP 结合状态受鸟苷酸交换因子 GEFs 的正调控, 受 GTP 酶激活蛋白 GAPs 的负调控^[4]。

研究发现, ARFs 对一些真菌的正常存活是不可或缺的^[10]。我们试图利用同源重组破坏 *BbarfA* 却一直没有获得成功, 推测 *BbarfA* 也可能是昆虫病原真菌球孢白僵菌生长和存活的必需因子。在构巢曲霉中, *ArfA* 与酵母 ARF1 和 ARF2 同源, 定位于高尔基体, 通过影响分泌途径介导菌丝生长。过表达 *ArfA* 导致孢子芽管变细变短^[10]。*ArfB* 与酵母 ARF6 同源, 参与菌丝顶点极性生长^[10]。本研究也发现, *BbarfA* 参与球孢白僵菌孢子萌发或芽管的极性生长, 下调 *BbarfA* 促进了孢子萌发, 而过表达 *BbarfA* 则延迟了孢子萌发, 但其具体机制尚需进一步探究。ARF 是 GTP 结合蛋白, 在序列和结构上属于 Ras 超家族的一员。在球孢白僵菌中过表达显性激活突变的 *Ras1* 基因(*Ras1*^{G19V})或显隐性非活性突变的 *Ras1* (*Ras1*^{D126A}), 增加胞内 *Ras1*-GTP 活性状态或 *Ras1*-GDP 非活性状态, 均不同程度地影响了分生孢子萌发和菌丝生长^[15]。本研究过表达 GTP 结合位点突变的 *BbarfA* (*BbarfA*^{Q71I})也延迟了孢子萌发, 推测过表达 *BbarfA*^{Q71I} 阻碍或削弱了 GTP 水解速度^[16], 导致野生菌株中存在过量的 *BbarfA*-GTP 激活状态, 在一定程度上抑制了孢子萌发或芽管极性生长。本文推测 *BbarfA* 的 GTP 解离序列位于第 24–31 位

氨基酸(GLDAAGKT), 突变第 26 位的 D 为 G (*BbarfA*^{D26G})并在野生菌株中过表达, 理论上可削弱解离与 *BbarfA*^{D26G} 结合的 GTP 水平, 增加胞内 *BbarfA*^{D26G}-GTP 活性状态。然而, 过表达 *BbarfA*^{D26G} 菌株的孢子萌发与野生菌株并无明显差异, 其具体机制尚有待于进一步明确。生物测定结果表明, *BbarfA* 对球孢白僵菌毒力的影响与其对孢子萌发的影响趋势相似, 即下调 *BbarfA* 提高了菌株毒力, 而超量表达 *BbarfA* 和 *BbarfA*^{Q71I} 则降低了菌株毒力。由此推测, *BbarfA* 在一定程度上通过介导孢子萌发而影响菌株毒力。

ARFs 参与调节分泌、内吞作用、吞噬作用等生物学过程^[4], 干扰胞内 ARFs 活性和非活性形式的循环稳态, 也可能导致相关生物学功能缺陷。如酵母 *ScArf1* 和 *ScArf2* 负责 COPI 笼形蛋白从顺面高尔基体到内质网的囊泡运输, 突变 *ScArf1* 导致菌株生长缓慢、对低温和氟敏感, 出现了多种分泌突变等表型, 影响菌株的逆境适应性^[17]。本研究中, 尽管 *BbarfA* 在球孢白僵菌中的转录受高盐、高渗、氧化和高温等胁迫的诱导, 但下调 *BbarfA* 以及超量表达 *BbarfA*、*BbarfA*^{D26G} 和 *BbarfA*^{Q71I} 菌株对这些胁迫条件的敏感性与野生菌株却无明显差异, 推测 *BbarfA* 可能对菌株高盐、高渗、氧化和高温等胁迫反应的作用较弱。当然, 我们也不排除反义抑制或超量表达基因强度不足, 尚未引起菌株对逆境胁迫反应的表型发生明显变化的可能性。

参考文献

- [1] Jian XY, Cavenagh M, Gruschus JM, Randazzo PA, Kahn RA. Modifications to the C-terminus of Arf1 alter cell functions and protein interactions. *Traffic*, 2010, 11(6): 732–742.
- [2] Neuwald AF. Bayesian classification of residues associated

- p>with protein functional divergence: Arf and Arf-like GTPases.
- Biology Direct*
- , 2010, 5(1): 66.
- [3] Logsdon JM Jr, Kahn RA. The Arf family tree//Kahn RA. Arf Family GTPases. Series Volume 1. Netherlands: Springer, 2003: 1–21.
- [4] D’Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(5): 347–358.
- [5] Volpicelli-Daley LA, Li YW, Zhang CJ, Kahn RA. Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(10): 4495–4508.
- [6] Donaldson JG. Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(43): 41573–41576.
- [7] Burd CG, Strohlic TI, Gangi Setty SR. Arf-like GTPases: not so Arf-like after all. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14(12): 687–694.
- [8] Bhattacharyya RP, Reményi A, Yeh BJ, Lim WA. Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 75: 655–680.
- [9] Yang ZB. Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *The Plant Cell*, 2002, 14(S1): S375–S388.
- [10] Lee SC, Shaw BD. Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 283(2): 216–222.
- [11] Jin K, Zhang YJ, Luo ZB, Xiao YH, Fan YH, Wu D, Pei Y. An improved method for *Beauveria bassiana* transformation using phosphinothricin acetyltransferase and green fluorescent protein fusion gene as a selectable and visible marker. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(8): 1379–1383.
- [12] Xiao YH, Yin MH, Hou L, Pei Y. Direct amplification of intron-containing hairpin RNA construct from genomic DNA. *BioTechniques*, 2006, 41(5): 548–552.
- [13] Saitoh O, Oshima T, Agata K, Watanabe K, Nakata H. Molecular cloning of a novel ADP-ribosylation factor (ARF) expressed in planarians. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) —Gene Structure and Expression*, 1996, 1309(3): 205–210.
- [14] Lundmark R, Doherty GJ, Vallis Y, Peter BJ, McMahon HT. Arf family GTP loading is activated by, and generates, positive membrane curvature. *Biochemical Journal*, 2008, 414(2): 189–194.
- [15] Xie XQ, Guan Y, Ying SH, Feng MG. Differentiated functions of Ras1 and Ras2 proteins in regulating the germination, growth, conidiation, multi-stress tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(2): 447–462.
- [16] Lanoix J, Ouwendijk J, Lin CC, Stark A, Love HD, Ostermann J, Nilsson T. GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COP I vesicles. *The EMBO Journal*, 1999, 18(18): 4935–4948.
- [17] Cosson P, Letourneur F. Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, 9(4): 484–487.

An ADP-ribosylation factor, BbarfA, is involved in conidial germination and virulence in *Beauveria bassiana*

Hai Liu^{1#}, Jing Zhao^{1,2#}, Xuebing Li¹, Pengfei Liu¹, Tingying Luo^{1,2}, Yongjun Zhang^{1,2*}

¹ Biotechnology Research Center, Southwest University, Chongqing 400715, China

² College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] To understand the number of ADP-ribosylation factor (ARFs) and their roles in *Beauveria bassiana*. [Methods] ARFs were identified by BLASTp searching against the database of *B. bassiana* proteins and analyzed using molecular phylogenetics. Role of an ARF in fungal growth, stress responses and virulence was characterized by analysis of the gene transcription pattern, and investigation of the genetically modified *B. bassiana* strains. [Results] At least six ARFs and ARF-like proteins (ARFLs) were identified in *B. bassiana*, which were distributed in different groups of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and human *Homo sapiens* ARFs and ARFLs. One of ARFs, BBA_01574, designated BbarfA, was clustered in the group of human ARF3, ARF4 and ARF5. Transcription levels of *BbarfA* were obviously higher in the mature conidia or during the isotropic growth (swelling) phase of conidia than those during germ tube elongation phase. Antisense inhibition of *BbarfA* accelerated conidial germination and resulted in an increase in fungal virulence, whereas overexpression of *BbarfA* and the gene with site-mutation in GTP-binding sequences (*BbarfA*^{Q71I}) caused the opposite phenotypes. Although expression of the gene was induced by high salt, osmotic, oxidative and high temperature stresses, no obvious difference was noted in sensitivities to these adverse stresses in all the genetically modified transformants, which included strains suppressing (by antisense inhibition) or overexpressing *BbarfA*, overexpressing the genes with site-mutation in GTP-dissociating (*BbarfA*^{D26G}) or GTP-binding (*BbarfA*^{Q71I}) sequences, and the wild type strains. [Conclusion] ADP-ribosylation factor, BbarfA, was involved in conidial germination and virulence in *B. bassiana*.

Keywords: ADP-ribosylation factor, *Beauveria bassiana*, conidial germination, virulence

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871668)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68250042; Fax: +86-23-68251883; E-mail: yjzhang@swu.edu.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 23 December 2016; Revised: 6 March 2017; Published online: 11 May 2017