

球孢白僵菌高渗适应性相关基因 *Bbmpd* 的克隆与表达分析

罗志兵^{1#}, 金凯^{1,2#}, 张永军¹, 武增强¹, 裴炎^{1*}

(¹ 西南大学生物技术中心, 农业部生物技术与作物品质改良重点实验室, 重庆 400716)

(² 重庆大学生物工程学院基因工程研究中心, 重庆 400030)

摘要:【目的】克隆与球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 的高渗适应性相关基因, 并对其功能进行分析, 以揭示球孢白僵菌对高渗等逆境适应的分子机理。【方法】利用 YADE 法克隆 T-DNA 的侧翼序列并进行基因组步行, 获得突变基因的全长及上游序列; 利用 RT-PCR 技术分析突变基因的表达特性以及与 *Bbhog1* 的关系; 采用同源重组技术敲除 *Bbmpd* 基因。【结果】克隆得到插入突变基因及其上、下游序列全长 3037 bp。该基因与编码球孢白僵菌的 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因相似性为 98%。*Bbmpd* 的表达受高渗环境 (0.8 mol/L NaCl) 的诱导, 受 *Bbhog1* 信号途径的激活调节, *Bbhog1* 缺失导致 *Bbmpd* 表达下调。*Bbmpd* 缺失突变体在高渗胁迫下的生长受到明显抑制。*Bbmpd* 缺失不影响球孢白僵菌在查氏培养基上的生长和产孢。【结论】由 T-DNA 突变体克隆了编码球孢白僵菌 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因 *Bbmpd*, 该基因的表达受高渗环境的诱导和 *Bbhog1* 的调控, 与球孢白僵菌高渗适应性相关。

关键词: 球孢白僵菌; 1-磷酸甘露醇脱氢酶; 高渗胁迫; YADE

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0724-05

球孢白僵菌是一种重要的昆虫病原真菌, 具有主动侵染寄主和能够形成流行病害等特点, 在农林害虫的生物防治中具有良好的应用前景^[1]。分生孢子是昆虫病原真菌最重要的侵染单位。释放到田间的分生孢子要经受紫外线、干旱、高温等逆境的考验, 才能萌发侵染寄主; 侵入寄主昆虫血腔的菌体不但要克服寄主的免疫反应, 而且要适应寄主血腔内的高渗环境才能定殖, 完成侵染致病^[2]。因此, 对逆境的适应性强弱在很大程度上决定了昆虫病原真菌应用效果的好坏。

多元糖醇是调节微生物抗逆性的重要物质。在丝状真菌中, 多元糖醇合成途径受阻导致其对多种逆境的适应能力以及分生孢子的贮藏寿命显著下

降^[3-5]。甘露醇是真菌中较为常见的一种多元醇, 除调节渗透压和贮藏营养外, 还具有氧自由基清除剂和逆境保护剂的作用。甘露醇合成受阻致构巢曲霉的分生孢子对氧、高温、冷冻等环境胁迫的适应能力显著下降^[5]。蚕豆单胞锈菌 (*Uromyces fabae*) 在侵染寄主植物过程中分泌大量的甘露醇, 这可能与病原菌克服寄主的 ROS (reactive oxygen species) 相关的防御反应机制有关^[6]。分泌甘露醇是新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 保护自身免受寄主吞噬细胞的氧化杀伤的重要方式^[7]。推测甘露醇可能参与病原真菌对寄主的致病过程。甘露醇是球孢白僵菌分生孢子中含量最高的一种多元醇^[8], 但甘露醇是否参与昆虫病原真菌对逆境适应性的调节以

基金项目: 国家高技术发展计划项目 (2006AA10A212); 重庆市自然科学基金项目 (CSTC2009BB1125); 西南大学博士基金项目 (SWUB2008072)

* 通信作者。Tel: +86-23-68251883; E-mail: peiyan3@swu.edu.cn

作者简介: # 对本文有同等贡献。罗志兵 (1974 -), 男, 河南郸城人, 博士, 主要从事杀虫真菌应用与基础研究。E-mail: luozbl@163.com; 金凯 (1978 -), 男, 辽宁本溪人, 博士, 主要从事杀虫真菌分子生物学研究。E-mail: Jinkai5219@163.com

收稿日期: 2009-12-30; **修回日期:** 2010-03-08

及对寄主昆虫的致病过程尚没有报道。

本研究通过高渗胁迫筛选到一个对高渗胁迫敏感的突变体,利用 YADE 技术克隆插入突变基因及其上下游序列,分析突变基因的表达特性,研究突变基因与球孢白僵菌对高渗环境适应性的关系,为明确甘露醇在球孢白僵菌逆境适应性中的作用以及与菌株致病性的关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) Bb0062 菌株,分离自感染的菜青虫 (*Pieris rapae*),保存于西南大学生物技术中心;根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* AGL1)用于球孢白僵菌的遗传转化操作,由宾夕法尼亚州立大学 Mark Guiltinan 博士惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: 凝胶回收纯化试剂盒、RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒、pGEM-T Easy Vector 试剂盒以及限制性内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司。电击仪为 Bio-RAD 公司产品。

1.2 高渗敏感突变体的获得与 T-DNA 侧翼序列的克隆

利用高渗胁迫的方法进行 T-DNA 突变体的筛选^[9]。T-DNA 侧翼序列的克隆按肖月华等的方法进行^[10]。

1.3 *Bbmpd* 的表达分析

分别将抽滤后的球孢白僵菌野生菌株与 *Bbhog1* 缺失突变体^[11] 新鲜菌丝等量接种于含 0.8 mol/L NaCl 的液体查氏培养基,于 26℃、180 r/min 条件下分别诱导 0、6 和 12 h,然后提取总 RNA,利用 RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒进行 RT-PCR。根据 *Bbmpd* 的编码序列设计引物 mpd-F/

mpd-R (见表 1),以 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 *Bgpd* 为内标基因^[11],分析 *Bbmpd* 的表达特性。

1.4 同源重组载体构建

利用引物 LF/LR、RF/RR 分别以球孢白僵菌基因组 DNA 为模板扩增得到同源重组的左臂与右臂片段 LB 和 RB。LB 克隆到 pGEM-T Easy 载体上,形成 pGEM-LB。用 *Spe* I / *Hind* III 酶切 PCR 产物 RB 并克隆到 pUC-bar 载体上,形成 pUC-bar-RB; *Eco* RI 单酶切 pGEM-LB,回收 LB 并克隆到 pUC-bar-RB 上,形成 pUC-LB-bar-RB。 *Spe* I / *Hind* III 酶切 pUC-LB-bar-RB,回收 LB-bar-RB 并克隆到负筛选标记 pZPtK 上^[12],形成同源重组载体 pZPtK-LB-bar-RB。构建载体所用引物序列见表 1。

1.5 同源重组转化子的筛选与验证

将同源重组载体 pZPtK-LB-bar-RB 用电击法导入根癌农杆菌 AGL1。利用根癌农杆菌介导的遗传转化方法进行 *Bbmpd* 基因的同源重组敲除。同源重组转化子的筛选根据 Ma 等^[12] 的方法进行。将所得到的抗除草剂的转化子接种到含有 5-氟去氧尿苷 (5-fluoro-2'-deoxyuridine, F2du) 查氏培养基上进行筛选,提取抗性转化子的基因组 DNA。根据 bar 表达元件中的终止子 *TrpC* 与 *Bbmpd* 的 RB 下游序列设计引物 *PtrpC* 和 DP,以及引物 mF 和 mR,利用 PCR 方法进行 *Bbmpd* 基因同源重组转化子的筛选与验证。

2 结果和分析

2.1 球孢白僵菌 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因及上游序列的克隆与分析

利用 YADE 法扩增得到球孢白僵菌 T-DNA 插入突变基因及其上下游序列 3037 bp。序列分析表明,突变基因与编码球孢白僵菌的 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因 (ACU32784)^[13] 相似性为 98%,故认为所克隆的基因为编码球孢白僵菌的 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因 *Bbmpd*。该基因的 ORF (Open Reading Frame) 全长为 1334 bp,含有一个 158 bp 的内含子,有典型的 GT...AG 边界。所克隆的 3037 bp 序列还包括 *Bbmpd* 起始密码子 (ATG) 上游序列 1332 bp 和终止密码子 (TGA) 下游序列 371 bp。

在 *Bbmpd* 基因的 ATG 上游 1332 bp 序列中含有一些推测的调控元件。存在 3 个类 TATA-box 和 4 个 CCAAT 等典型的启动子元件。ATG 上游-966 bp 处含有一个压力反应元件 STREs (CCCCT),该元件在压力胁迫如高渗、高温、氧化以及营养饥饿

表 1 文中所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')*	Restriction enzyme site
mpd-F	CAAGGCTGTTTCATTTCCGGTG	
mpd-R	GATGAACTCGGCAAGGGTGT	
LF	ATAGTCGGCAAAGTCAGG	
LR	ATCGGCAAATACGACCTC	
RF	<u>TG</u> ACTAGTCAGACTGAGTCCAAGAT	<i>Spe</i> I
RR	<u>CCCAAGCTTTCAAGGTCTAGACAGCCA</u>	<i>Hind</i> III
<i>Ptrp</i>	TCATCGTAGGTATAAACCTC	
DP	TGCATACCATAGCCACTCTG	
mF	CATCATCATGGCTCCCAAGG	
mR	ACCAAAGAAAACCTCACAGC	

* Underlined sequences are protection bases and restriction sites.

等条件下,介导酵母相关基因的转录激活。ATG 上游-813 bp 和-341 bp 处各含有一个与曲霉的碳源代谢阻遏蛋白 CREA 结合序列(SYGGRG)相一致的元件 GTGGAG 和 CCGGAG。

2.2 *Bbmpd* 的表达分析

在球孢白僵菌野生菌株中,不经高渗环境的诱导(即诱导 0 h),*Bbmpd* 的表达水平较低,一旦受到高渗环境的诱导(诱导 6 h 和 12 h),其表达水平显著提高(如图 1 所示)。Hog1 (high-osmolarity glycerol pathway) 信号途径广泛存在于丝状真菌中,真菌感受高渗环境胁迫诱导后,通过 Hog1 途径调节胞内的膨压以适应逆境密切相关。为明确 *Bbmpd* 的表达是否受球孢白僵菌的 Hog1 MAPK 同源基因 *Bbhog1* 的影响,利用 RT-PCR 检测了 *Bbhog1* 缺失突变体中 *Bbmpd* 在正常条件下与高渗透诱导条件下的表达水平。结果显示,在 *Bbhog1* 缺失突变体中,*Bbmpd* 的表达显著下调;在高渗环境的诱导下,其表达水平得到一定的上调,但仍明显低于野生菌株中的表达水平(如图 1 所示)。

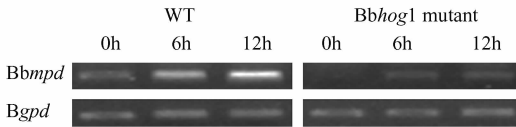


图 1 RT-PCR 分析 *Bbmpd* 的表达特性

Fig. 1 Analysis of *Bbmpd* expression by RT-PCR.

2.3 *Bbmpd* 同源重组转化子的筛选与验证

将所构建的同源重组载体用根癌农杆菌介导法导入野生型球孢白僵菌,提取抗性菌株的基因组 DNA 进行 PCR 筛选与验证。按照设计,如果 *Bbmpd* 基因发生同源重组,*Bbmpd* 编码区内 71 bp 片段被 bar 表达元件(1.7 kb)所取代,不能扩增出与 *Bbmpd* 预计大小的片段。PCR 结果表明,利用引物 mF/mR 进行扩增,野生菌株与转化子 M18 可以扩增出与预计大小一致(约 1.7 kb)的片段,而转化子 M9、M13、M17 不能扩增得到相应的片段(如图 2-A 所示);利用 TtrpC/DP 进行扩增验证,野生菌株与转化子 M18 不能扩增得到特异片段,而转化子 M9、M13、M17 可以扩增得到约 1.7 kb 大小的片段(如图 2-B 所示),与预计相一致。该片段回收测序结果证实转化子 M9、M13、M17 确实发生了同源重组。

2.4 *Bbmpd* 同源重组转化子的分析

对所获得的同源重组转化子和野生菌株进行对比分析。发现 *Bbmpd* 同源重组转化子在查氏培养基上菌落没有明显的表型变化(如图 3-A, B 所示)。

但在高渗胁迫条件下,*Bbmpd* 同源重组转化子的生长较野生菌株和随机插入转化子慢(如图 3-C, D 所示)。在查氏培养基上,同源重组转化子的生长速度、产孢量均没有显著变化。以上结果表明,*Bbmpd* 与球孢白僵菌的高渗适应性有关,其缺失不影响球孢白僵菌的正常生长和产孢(表 2)。

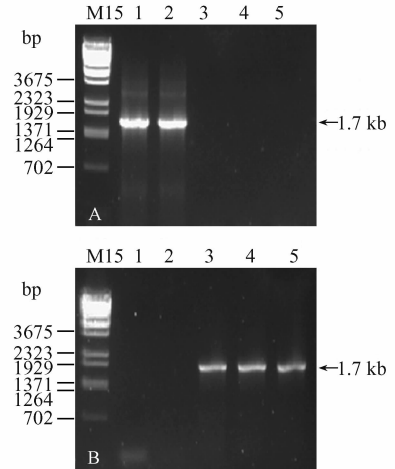


图 2 *Bbmpd* 同源重组转化子的 PCR 筛选与验证

Fig. 2 Screening of *Bbmpd*-disrupted transformants by PCR. The putative transformants (lane 2-5) and wild type strain (lane 1) were first screened by PCR with primers mF/mR (A) or with specific primers TtrpC/DP (B). Lane 2, 3, 4 and 5 were respectively the transformants M18, M9, M13 and M17.

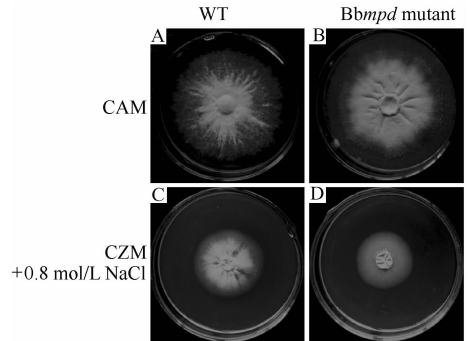


图 3 *Bbmpd* 缺失突变体菌落形态

Fig. 3 The colony morphology of wild type strain and *Bbmpd*-disrupted mutant. Wild type strain Bb0062 (WT) and *Bbmpd*-disrupted mutant were respectively incubated on Czapek medium (A and B) or Czapek supplemented with 0.8 mol/L NaCl at 26°C for 2 weeks.

3 讨论

甘露醇在维持丝状真菌的分生孢子的存活寿命方面具有重要作用,它可能是作为一种贮存碳源或保护剂降低孢子活性以延长寿命^[14]。以 6-磷酸果糖为底物,由 1-磷酸甘露醇脱氢酶催化形成磷酸甘

露醇, 然后去磷酸化形成甘露醇, 这是丝状真菌合成甘露醇的一条重要途径^[5]。Ruijter 等将黑曲霉的 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因 *mpd* 敲除后, 突变体分生孢子中甘露醇含量显著下降, 分生孢子对热激、冷冻、氧化等逆境的适应能力也显著降低^[5]。本研究将球孢白僵菌 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因敲除, 从而阻断甘露醇合成的这一途径, 甘露醇在球孢白僵菌中的生理作用以及与球孢白僵菌的逆境耐受性的关系有待于进一步研究。

表 2 各菌株的产孢与生长

Table 2 Conidia yield and growth of wild type strain, ecotopic integration and *Bbmpd*-disrupted mutants

Strain ^a	Conidial yield/ (conidia/mm ²)	Diameter/mm
Wild type	4.04 ± 0.44 × 10 ⁷	32.5 ± 0.84
M9	4.20 ± 0.37 × 10 ⁷	32.8 ± 0.75
M13	4.13 ± 0.40 × 10 ⁷	32.0 ± 0.63
M17	4.04 ± 0.38 × 10 ⁷	33.0 ± 0.63
M18	3.96 ± 0.48 × 10 ⁷	32.0 ± 0.89

^a M9, M13 and M17 are the *Bbmpd*-disrupted mutants, and M18 is the ecotopic integration.

1-磷酸甘露醇脱氢酶基因 *Bbmpd* 的启动子区域含有 1 个压力反应元件, 推测该基因的表达可能与逆境胁迫反应有关。RT-PCR 结果显示, *Bbmpd* 的表达受到高渗环境的诱导; *Bbmpd* 基因敲除后, 突变体在高渗环境下的生长也较野生菌株滞后。基于以上分析, 推测 *Bbmpd* 与球孢白僵菌对高渗环境的适应性相关。丝状真菌对高渗环境的适应性受到 Hog1 信号途径的调节, 在高渗环境诱导下, 甘油合成相关酶基因被激活, 积累高浓度的多元糖醇以维持调节胞内的膨压^[15]。本研究对球孢白僵菌的 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因的表达是否受到 Hog1 信号途径的调节也进行了探讨。在 *Bbhog1* 缺失突变体中, *Bbmpd* 的表达较野生菌株明显下调, 但仍受到高渗环境的诱导, 诱导下的表达水平也较野生菌株明显偏低。这一结果表明 *Bbmpd* 的表达明显受到 Hog1 途径的调控。这一结果也与高渗条件下多种多元糖醇的积累都得到不同程度提高的结论相一致^[8,11]。在 *Bbhog1* 缺失突变体中, *Bbmpd* 仍有一定水平的表达, 表明 *Bbmpd* 还有其它调控途径的存在。

黑曲霉中 *mpd* 在产孢菌丝中的表达水平显著高于营养菌丝, 产孢菌丝内的 MPD 活性是营养菌丝的 6 倍以上, 暗示 *mpd* 可能与产孢有关^[5]。对于小麦叶枯病菌 (*Stagonospora nodorum*), *mpd1* 缺失不影响其正常生长、产孢与毒力, 但感染小麦后不能产

孢^[16]。由此可见, *mpd* 在不同丝状真菌中的功能也不尽相同。与野生菌株相比, 球孢白僵菌 *Bbmpd* 缺失突变体在查氏培养基上的产孢量没有显著差异 (见表 2), 其毒力及相关性状的检测正在进行中。

本研究通过表达特性分析与基因敲除证实 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因 *Bbmpd* 与球孢白僵菌的高渗适应性相关。研究结果为进一步明确甘露醇在球孢白僵菌逆境适应性中的生理功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Charnley AK. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, 2003, 40: 241-321.
- [2] Wang CS, Duan ZB, St. Leger RJ. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(2): 302-309.
- [3] de Vries RP, Flitter SJ, van de Vondervoort PJ, Chaverocche MK, Fontaine T, Fillinger S, Ruijter GJ, d'Enfert C, Visser J. Glycerol dehydrogenase, encoded by *gldB* is essential for osmotolerance in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 2003, 49: 131-141.
- [4] Fillinger S, Chaverocche MK, van Dijck P, de Vries R, Ruijter JG, Thevelein J, d'Enfert C. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 2001, 147: 1851-1862.
- [5] Ruijter JG, Bax M, Patel H, Flitter SJ, van de Vondervoort JI, de Vries RP, vanKuyk PA, Visser J. Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryotic cell*, 2003, 2(4): 690-698.
- [6] Voegelé RT, Hahn M, Lohaus G, Link T, Heiser I, Mendgen K. Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiology*, 2005, 137: 190-198.
- [7] Chaturvedi V, Wong B, Newman SL. Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils: evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *The Journal of Immunology*, 1996, 156: 3836-3840.
- [8] Hallsworth JE, Magan N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology*, 1995, 141: 1109-1115.
- [9] Luo ZB, Zhang YJ, Jin K, Ma JC, Wang X, Pei Y. Construction of *Beauveria bassiana* T-DNA insertion mutant collections and identification of thermosensitive and osmosensitive mutants. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(10): 1301-1305.

- [10] 肖月华, 罗明, 方卫国, 罗克明, 侯磊, 罗小英, 裴炎. 利用 YADE 法进行棉花基因组 PCR 步行. 遗传学报 (*Acta Genetica Sinica*), 2002, 29(1): 62-66.
- [11] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3787-3795.
- [12] Ma JC, Zhou Q, Zhou YH, Liao XG, Zhang YJ, Jin D, Pei Y. The size and ratio of homologous sequence to non-homologous sequence in gene disruption cassette influences the gene targeting efficiency in *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82: 891-898.
- [13] Wang ZL, Ying SH, Feng MG. Gene cloning and catalysis features of a new mannitol-1-phosphate dehydrogenase (BbMPD) from *Beauveria bassiana*. *Carbohydrate Research*, 2010, 345(1): 50-54.
- [14] Witteveen CF, Visser J. Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 134: 57-62.
- [15] Zhang Y, Lamm R, Pillonel C, Pillonel C, Lam S, Xu JR. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa os-2* gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 532-538.
- [16] Solomon PS, Tan KC, Oliver RP. Mannitol 1-phosphate metabolism is required for sporulation in planta of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(2): 110-115.

Cloning and expression of the osmotic tolerance gene *Bbmpd* of *Beauveria bassiana*

Zhibing Luo^{1#}, Kai Jin^{1,2#}, Yongjun Zhang¹, Zengqiang Wu¹, Yan Pei^{1*}

(¹Key Laboratory of Biotechnology and Crop Quality Improvement of Ministry of Agriculture of China, Biotechnology Research Center, Southwest University, Chongqing 400716, China)

(²Genetic Engineering Research Center, Institute of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: [**Objective**] We isolate the gene involved in osmotolerance of *Beauveria bassiana* for investigation the adaptation mechanism of the fungus to adversity. [**Methods**] T-DNA tagging and genomic DNA walking were carried out by using Y-shaped adaptor dependent extension (YADE) method. RT-PCR was used to analyze the transcription profile of *Bbmpd*. [**Results**] A gene (*Bbmpd*) encoding mannitol 1-phosphate dehydrogenase in *B. bassiana* was identified. The transcription of *Bbmpd* was induced by osmstress (0.8 mol/L NaCl) in wild type strain, while significantly decreased in *Bbhog1* mutant, indicating that the transcription of *Bbmpd* was regulated by Hog1 pathway in *B. bassiana*. *Bbmpd*-disrupted mutants showed sensitive to osmstress on Czapek's medium containing 0.8 mol/L NaCl. However, the growth and sporulation of the *Bbmpd*-disrupted mutants in vitro were not significantly different from that of wild type strain. [**Conclusion**] Mannitol 1-phosphate dehydrogenase gene was isolated by T-DNA tagging, and was found to be involved in the osmstress of *B. bassiana*. The transcription of *Bbmpd* was induced by osmstress and regulated by Hog1 pathway.

Keywords: *Beauveria bassiana*; mannitol 1-phosphate dehydrogenase; osmstress; Y-shaped adaptor dependent extension

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A212), the Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (2009BB1125) and the Research Foundation of Southwest University (SWUB2008072)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68251883; E-mail: peiyan3@swu.edu.cn

These authors contributed equally to this work.

Received: 30 December 2009 / Revised: 8 March 2010