

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(1):24-30; 4 January 2013  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 比较两种昆虫病原真菌中结构相似的 ATP 结合匣转运蛋白的抗氧化力与多药抗性

赵静, 宋婷婷, 应盛华, 冯明光\*

浙江大学生命科学学院微生物研究所, 杭州 310058

**摘要:** 【目的】比较分析球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) BbT1 和玫烟棒束孢 (*Isaria fumosorosea*) IfT1 两种结构相似的 ATP 结合匣转运蛋白的生物学功能。【方法】基于 Bb2860 野生株构建 *BbT1* 的敲除株和回补株, 并将 *IfT1* 在 *BbT1* 敲除株中异源重组表达, 比较各菌株的表型变化。【结果】与野生株、回补株及异源重组株相比, 敲除株对 20-40 mmol/L 过氧化氢和 2-8 mmol/L 甲萘醌氧化胁迫的抵抗力下降 27% - 2.1 倍, 对多菌灵、伊曲康唑、菌核净、放线菌酮、乙嘧酚和 4-硝基喹啉 N-氧化物等不同类型化学药物的抗药性下降 28% - 4.7 倍, 对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 二龄幼虫的毒力下降 20% 左右, 而野生株、回补株及异源重组株之间无任何表型的显著差异。【结论】BbT1 和 IfT1 是结构相似且功能一致的转运蛋白, 分别是两种生防真菌多药抗性的决定因子之一, 因参与抗氧化反应而对毒力有所贡献。

**关键词:** 球孢白僵菌, 玫烟棒束孢, ATP 结合匣转运蛋白, 基因表达, 多药抗性, 抗氧化, 毒力

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 01-0024-07

ATP 结合匣转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter proteins) 简称 ABC 转运蛋白, 广泛存在于真核细胞, 构成一个庞大而多样的蛋白家族, 利用水解 ATP 的能量对胞内各种生物分子及有害异物 (xenobiotics) 进行跨膜转运, 其转运的底物包括糖、氨基酸、金属离子、多肽、蛋白质、代谢产物和药物等, 具有依赖 ATP 结合域的单向底物转运泵特征<sup>[1]</sup>。目前已知, 人类基因组有 ABC 转运蛋白基因 48 个<sup>[2]</sup>, 酿酒酵母中有 30 个<sup>[3]</sup>, 大肠杆菌 K-12 中至少有 80 个<sup>[4]</sup>。

能够跨膜转运有害异物的 ABC 转运蛋白的表达程度, 是细胞对许多药物产生抗性的重要原因, 如人类 P 糖蛋白的过量表达导致癌细胞产生多药抗

性 (multidrug resistance, MDR)<sup>[5]</sup>。多药抗性即细胞对若干结构不同药物的抗性的研究始于肿瘤细胞及人体病原菌, 其产生主要依赖于细胞膜上 ABC 转运蛋白对药物的泵出作用<sup>[6]</sup>。

肿瘤细胞、人体病原菌及植物病原菌的多药抗性严重威胁人类疾病和作物病害的防治。然而, 害虫生防真菌的多药抗性却是值得利用的有益性状。这是因为真菌杀虫剂大多以生防真菌的单细胞分生孢子为有效成份, 田间应用时难免同化学除草剂、杀菌剂、杀虫剂相遇, 而很多化学农药同真菌分生孢子是不相容的, 因而影响到生防真菌制剂的田间杀虫效果<sup>[7]</sup>。因此, 从分子水平上解析生防真菌的多药抗性机制, 对于通过遗传改良提高生防菌剂与各类

基金项目: 国家“973 项目”——国家重大基础研究发展规划 (2009CB118904); 国家自然科学基金 (30930018, 30971960)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-571-88201978; E-mail: mgfeng@zju.edu.cn

作者简介: 赵静 (1988-), 女, 四川射洪人, 硕士研究生, 从事微生物分子生物学研究。

收稿日期: 2012-08-11; 修回日期: 2012-10-17

化学农药的相容性具有重要意义。在植物病原真菌的抗性研究中,有不少  $\beta$ -微管蛋白点突变诱发病原菌对苯并咪唑类杀菌剂抗药性的报道<sup>[8-11]</sup>,类似点突变也存在于高抗多菌灵的球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 的诱变菌株中<sup>[12]</sup>。但是, $\beta$ -微管蛋白的点突变很难解释白僵菌数个诱变菌株对多菌灵的极高抗性,多菌灵抑制其菌落生长 50% 所需的浓度甚至超过培养基的溶解度 ( $\sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>[12]</sup>。我们新近在对玫烟棒束孢 (*Isaria fumosorosea*) 高抗多菌灵的多个诱变菌株的分析中,并未发现有意义的  $\beta$ -微管蛋白点突变,却发现一个 ABC 转运蛋白基因 (*Ift1*) 启动子区域 3 个转录因子发生相同的点突变,导致该基因在高抗菌株中超高表达,从而对包括多菌灵在内的多种杀菌剂表现高抗<sup>[13]</sup>。这说明生防真菌同人体病原菌一样,存在着依赖于 ABC 转运蛋白、且比  $\beta$ -微管蛋白点突变更具广泛性的多药抗性机制。在对球孢白僵菌基因组数据<sup>[14]</sup>的分析中,我们发现该菌的一个 ABC 转运蛋白 (BbT1) 与玫烟棒束孢 *Ift1* 的氨基酸序列相似性高达 92%,而且都具有  $[\text{NBT-TMD}_6]_2$  拓扑结构。

本研究旨在运用基因敲除、回补和异源重组的方法,比较分析 BbT1 和 *Ift1* 的生物学功能,为生防真菌多药抗性的研究利用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、质粒及试剂

玫烟棒束孢 116 (If116) 和球孢白僵菌 ARSEF 2860 (Bb2860) 均为野生菌株,分别源自美国农业部生物防治研究所 (Weslaco, Texas) 和美国农业部 ARSEF 生防菌种库 (Ithaca, New York)。从 Bb2860 中敲除 *BbT1* 的突变株  $\Delta BbT1$  由本实验室先期构建<sup>[15]</sup>。供试菌株均在 25°C 和 12:12 h 光周期条件下培养于萨氏培养基 SDAY 平板上。根癌农杆菌

*Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 在 28°C 下培养于 YEB (0.5% 蔗糖,1% 蛋白胨,0.1% 酵母粉,0.05%  $\text{MgSO}_4$ ) 用于球孢白僵菌转化。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 用 LB 培养基在 37°C 下培养,用于质粒扩增及分子克隆。质粒 p0380-sur 由本实验室先期构建<sup>[16]</sup>,用于回补和异源重组质粒的构建。

Gateway<sup>®</sup> BP Clonase TM II Enzyme Mix 购自 Invitrogen (Shanghai, China),质粒提取试剂盒、PCR 清洁回收试剂盒和胶回收试剂盒自购 Omega (Doraville, GA, USA),Southern 核酸杂交试剂盒购自 Roche (Mannheim, Germany),*Taq* 酶购自 Promega (WI, USA),LATAq 酶购自 TaKaRa (中国大连),酵母粉和蛋白胨购自 Merck (Darmstadt, Germany)。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 DNA 提取

将 Bb2860 和 If116 分生孢子悬液分别接种于 SDAY 平板表面的玻璃纸 (cellophane) 上,于 25°C 下培养 3-4 d 后收获菌丝,总 DNA 的提取参照文献 [17]。

### 1.3 *BbT1* 和 *Ift1* 的克隆与表达载体构建

参照 Bb2860 基因组 (NCBI accession number: ADAH00000000) 中 *BbT1* 序列 (BBA\_01781),设计成对扩增引物 BbT1-F1/R1 (表 1)。PCR 反应体系:50 ng 真菌 cDNA、0.2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  引物、0.2 mmol/L dNTP、2.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、1  $\times$  LATAq 聚合酶缓冲液和 2.5 U LATAq 聚合酶。PCR 循环条件:94°C 5 min;94°C 30 s,60°C 30 s,72°C 8 min,35 个循环;72°C 7 min。PCR 产物和质粒 p0380-sur-gateway 在 Gateway<sup>®</sup> BP Clonase TM II Enzyme Mix 的作用下,交换 gateway 元件。其产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,获得回补  $\Delta BbT1$  的质粒 p0380-sur-*BbT1*。参照 *Ift1* 基因序列 (GenBank ID: JN170112)<sup>[15]</sup> 设计扩增引物 *Ift1*-F1/R1 (表 1),从 If116 中扩增 *Ift1* 构建异源重组质粒 p0380-sur-*Ift1*,扩增体系、程序及质粒构建方法同上。

表 1 用于基因克隆及表达的相关引物

Table 1 A list of primers designed for gene cloning, manipulation and identification.

Primers	Sequences (5'→3')	Purpose
BbT1-F1/R1	GGTTGTGGTCTCGCTCATTCTT/GGGCAGGGTATTCTGGATTGA	Cloning <i>BbT1</i>
BbT1-F2/R2	GTCCGTGGTGTCTCGGTGGT/GGATGGCTTGTCTGTATTCTCTCA	PCR for <i>BbT1</i>
BbT1 Probe-F/R	ACCGCAACGCTGAACCTACT/TCTTCGCTTCCCTCTGTTAT	Probing <i>BbT1</i>
<i>Ift1</i> -F1/R1	ACCACCGCCGATCAAGAATG/CCCGTCCCAAACCGAGATAC	Cloning <i>Ift1</i>
<i>Ift1</i> -F2/R2	GGAATCCATATGTGGTGTGGTGGCTAC/CCCAAGCTCCGCATACTCGTCCATTTC	PCR for <i>Ift1</i>
<i>Ift1</i> Probe-F/R	GGAATCCATATGTGGTGTGGTGGCTAC/CCCAAGCTCCGCATACTCGTCCATTTC	Probing <i>Ift1</i>

#### 1.4 根癌农杆菌介导的真菌转化

将质粒 p0380-sur-*BbT1* 和 p0380-sur-*Ift1* 各 1  $\mu\text{L}$  分别加入到农杆菌 AGL-1 感受态细胞中,混匀后液氮速冻 5 min,转入 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴热激 5 min,冰浴 2 min 后加入装有 1 mL YEB 培养液,于 28 $^{\circ}\text{C}$  下振荡 (220 r/min) 培养 3 h。取 100  $\mu\text{L}$  菌液涂于含羧苄霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和卡那霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 YEB 平板<sup>[20]</sup> 上,28 $^{\circ}\text{C}$  培养 2 d 后挑斑鉴定,阳性转化子保存备用。

参照文献 [18] 的方法,将已转入目的质粒的农杆菌划线培养于 YEB 平板 (羧苄霉素和卡那霉素含量同上),28 $^{\circ}\text{C}$  培养 2 d 后接种于 3 mL YEB 培养液中 (羧苄霉素和卡那霉素含量同平板),28 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 16–20 h,将培养液离心 3 min,再用含 10 mM 葡萄糖和 400  $\mu\text{mol}/\text{L}$  乙酰丁香酮的 IMAS 培养液<sup>[19]</sup> 将菌体重悬至 OD<sub>600</sub> 值 0.10–0.15。继续避光孵育 6–7 h,至菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.4 左右,待用。

从培养 7 d 的 SDAY 斜面上刮取适量  $\Delta BbT1$  孢子粉于 1 mL 0.02% 吐温 80 中,配制成 10<sup>7</sup> 个分生孢子/mL 的悬液。将孢子悬液 100  $\mu\text{L}$  与上述农杆菌菌液各 100  $\mu\text{L}$  混匀,涂布于含 5 mmol/L 葡萄糖和 400  $\mu\text{mol}/\text{L}$  乙酰丁香酮的 IMAS 平板上,25 $^{\circ}\text{C}$  下避光共孵育 2 天后,用 3–5 mL 无菌水洗涤共孵育产物。将混匀的洗涤物 200  $\mu\text{L}$  涂布于含 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  氯嘧磺隆和 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  噻孢霉素的 M-100 平板<sup>[20]</sup> 上,25 $^{\circ}\text{C}$  下培养 5–6 d,挑选转化子到 48 孔板中,培养 3–4 d 后进行鉴定。

#### 1.5 转化子鉴定

**1.5.1 PCR 鉴定:** 从敲除、回补及异源重组转化子培养物中提取 DNA 进行 PCR 分析,分别用引物 BbT1-F2/R2 和 Ift1-F2/R2 (表 1) 检测目的基因与抗性标记的有无,并以野生株作为对照。

**1.5.2 Southern 杂交:** 取回补株  $\Delta BbT1/BbT1$  和异源重组株  $\Delta BbT1/Ift1$  基因组 DNA 各 40  $\mu\text{g}$ , 分别经 *Bgl*III 酶切和 *Kpn*I 酶切反应 6 h, 以野生株为对照, 采用试剂盒 (DIG High Prime DNA labeling and Detection Starter Kit II) 标签方法制备相应的杂交探针并测定核酸浓度。对酶切片段进行 0.7% 琼脂糖凝胶恒压电泳, 用半干转印仪电转移 15–30 min (3.55 mA/cm<sup>2</sup>) 至尼龙膜上。转移结束后, 膜用 2  $\times$  SSC 洗涤 15 min, 缓冲液中轻轻震荡 15 min, 共

两次, 再用 2  $\times$  SSC 洗涤中和至中性。尼龙膜置于杂交炉中 42 $^{\circ}\text{C}$  预杂交 2 h, 倾去预杂交液, 加 BbT1 或 Ift1 探针 (表 1) 至终浓度 150 ng/mL, 42 $^{\circ}\text{C}$  杂交过夜。杂交后先在 25 $^{\circ}\text{C}$  下洗涤两次 (2  $\times$  SSC + 0.1% SDS), 每次 15 min; 再在 68 $^{\circ}\text{C}$  下洗涤两次 (0.5  $\times$  SSC + 0.1% SDS), 每次 15 min。参照试剂盒在 25 $^{\circ}\text{C}$  下进行免疫检测, 显影记录。

#### 1.6 表型分析

**1.6.1 菌落生长抗氧化力测定:** 取野生株、敲除株、回补株及异源重组株分生孢子液 (10<sup>7</sup> 个/mL) 各 100  $\mu\text{L}$ , 分别均匀涂布于贴有玻璃纸的 SDAY 平板上, 25 $^{\circ}\text{C}$  下培养 3 天。从各平板上钻切直径 5 mm 的菌片, 分别贴在含 20–80 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 2–8 mmol/L 甲萘醌的 1/4 SDAY 平板 (直径 9 cm) 中央。

**1.6.2 菌落生长抗药性测定:** 将上述各菌株直径 5 mm 的菌片贴在含不同药物的 1/4 SDAY 平板上, 药物及浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 分别为多菌灵 0.5、伊曲康唑 5、菌核净 100、4-硝基喹啉 N-氧化物 10、放线菌酮 20、乙嘧酚 1000、三环唑 100、噻菌酯 100、啶菌灵 400 及刚果红 500。其中, 刚果红为胞壁生物合成抑制剂, 4-硝基喹啉 N-氧化物为有致癌作用的防腐剂, 其余均为不同类型杀菌剂。

贴片接种后, 氧化胁迫与药物胁迫的所有平板均在 25 $^{\circ}\text{C}$  和 12:12 h 光周期条件下培养 6 d, 然后十字交叉法测量菌落直径。以无胁迫的处理为对照, 每处理重复 3 次。各胁迫处理的菌落直径用于计算其表为百分率的相对生长抑制率  $RGI = (C - S) / (C - 0.2) \times 100$ , 其中  $C$  表示各菌株在对照板上生长 6 d 的菌落面积,  $S$  表示各菌株在特定胁迫下生长 6 d 的菌落面积。

**1.6.3 毒力测定:** 将各菌株分生孢子悬于 0.02% 吐温 80 中, 配制成 2  $\times$  10<sup>7</sup> 个孢子/mL 的标准化悬液。将斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 二龄幼虫 30–40 头为一组, 转至有直径约 10 cm 的新鲜甘蓝叶圆片的培养皿中, 再置于自动喷塔 (Burkard Scientific Ltd, Uxbridge, Middx, UK) 的载物台上, 在 0.7 kg/cm<sup>2</sup> 压力下将各菌株的 1 mL 孢子悬液分别自上而下喷至载物台, 沉降 30 秒后取出培养皿并加盖, 然后在 25 $^{\circ}\text{C}$  和 12:12 L:D 条件下饲养 7 d, 每天更换新鲜叶片并定时记录死亡虫数。以喷等量无菌 0.02% 吐温 80 的处理作为空白对照, 每个生测均重

复 3 次。所获随时间变化的死亡数据, 采用 DPS 软件<sup>[21]</sup> 进行机值分析, 计算各菌株标准化接种处理后的致死中时  $LT_{50}$ 。

## 2 结果和分析

### 2.1 目的基因在转化子中的表达

对各菌株 DNA 样品的 PCR 分析显示, 从野生株和回补株中均扩得 491 bp 的 *BbTl* 片段, 但敲除株中检测不出这一片段, 只检测到带 *bar* 抗性标记

基因的 1.2 kb 片段, 而回补株中两条带均存在, 异源重组株中扩得 914 bp 的 *IfTl* 片段 (图 1-A)。在 Southern 杂交中, 野生株仅显示约 4 kb 的 *BbTl* 条带, 回补株中存在 4 kb 和 8 kb 两条带, 敲除株仅有 8 kb 条带 (图 1-B), 从异源重组株中检测到 3 kb (*IfTl* 片段) 和 9 kb 两条带, 而野生株 Bb2860 中无任何条带 (图 1-C)。这些结果说明 *BbTl* 基因被成功敲除和回补, 而且玫瑰棒束孢的 *IfTl* 在 *BbTl* 敲除株中成功表达, 即实现了异源重组。

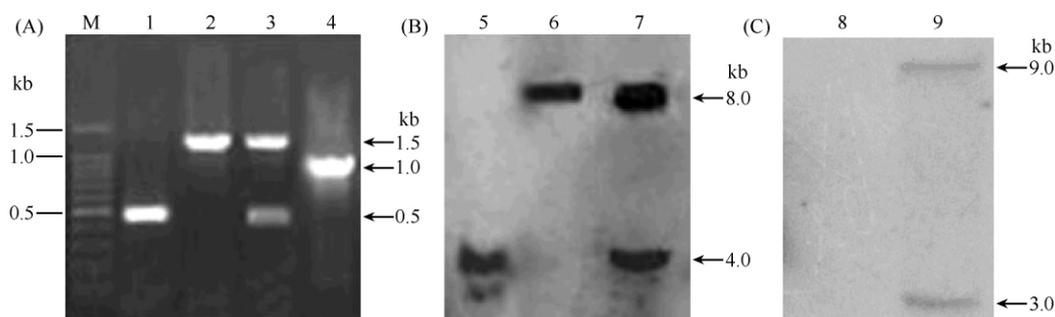


图 1 PCR (泳道 1-4) 与 Southern 杂交 (泳道 5-9) 检测目的基因在野生株 Bb2860 (泳道 1、5 和 8)、敲除株  $\Delta BbTl$  (泳道 2 和 6)、回补株  $\Delta BbTl/BbTl$  (泳道 3 和 7) 和异源重组株  $\Delta BbTl/IfTl$  (泳道 4 和 9) 中的表达

Fig. 1 PCR (Lanes 1-4) and Southern blotting (Lanes 5-9) analyses for the expression of the target gene in Bb2860 (Lanes 1, 5 and 8),  $\Delta BbTl$  (Lanes 2 and 6),  $\Delta BbTl/BbTl$  (Lanes 3 and 7) and  $\Delta BbTl/IfTl$  (Lanes 4 and 9), respectively.

### 2.2 表型变化

**2.2.1 菌落生长抗氧化力变化:** 在无胁迫的 1/4 SDAY 上生长 6 d 后, 野生株、敲除株、回补株及异源重组株的菌落大小一致 ( $F_{3,8} = 1.5$ ,  $P = 0.29$ )。在氧化胁迫下, 所有供试菌株的菌落面积 (图 2-A, B) 都随胁迫强度的增大而减小。在 20-40 mmol/L  $H_2O_2$  和 2-8 mmol/L 甲萘醌的氧化胁迫下, 敲除株的相对生长抑制率显著高于野生株、回补株及异源重组株 (Tukey's HSD,  $P < 0.05$ ), 但各菌株对 60 和 80 mmol/L  $H_2O_2$  的胁迫反应差异不显著, 野生株、回补株及异源重组株对各氧化剂任意浓度的反应均无显著差异。同野生株、回补株及异源重组株的相对生长抑制率均值相比, 敲除株对 20 和 40 mmol/L  $H_2O_2$  氧化胁迫的抵抗能力分别下降 1.3 倍和 35%, 对 2、4、6 及 8 mmol/L 甲萘醌氧化胁迫的抵抗力分别下降 2.1 倍、47%、36% 和 27%。

**2.2.2 菌落生长药物敏感性变化:** 在多菌灵、伊曲康唑、菌核净、4-硝基喹啉 N-氧化物、放线菌酮、乙嘧啶的药物胁迫下, 敲除株的相对生长抑制率均显著高于野生株、回补株及异源重组株 (Tukey's HSD,  $P < 0.05$ ), 后 3 株菌之间则无显著差异 (图 1-C)。但是, 所有供试菌株对三环唑、嘧菌酯、啶菌灵及刚果红的敏感性均无显著差异。与野生株、回补株及异源重组株的相比, 敲除株对多菌灵、伊曲康唑、菌核净、4-硝基喹啉 N-氧化物、放线菌酮及乙嘧啶的抗性分别下降 92%、28%、1.1 倍、37%、3.1 及 4.7 倍。

**2.2.3 毒力变化:** 斜纹夜蛾二龄幼虫随接种后时间而变化的校正死亡数据经机值分析, 敲除株的  $LT_{50}$  为 5.03 d, 显著长于野生株、回补株及异源重组株的  $LT_{50}$  均值 4.21 d, 而后三株之间无显著性差异 (图 2-D)。这一结果说明敲除株的毒力下降了 19%。

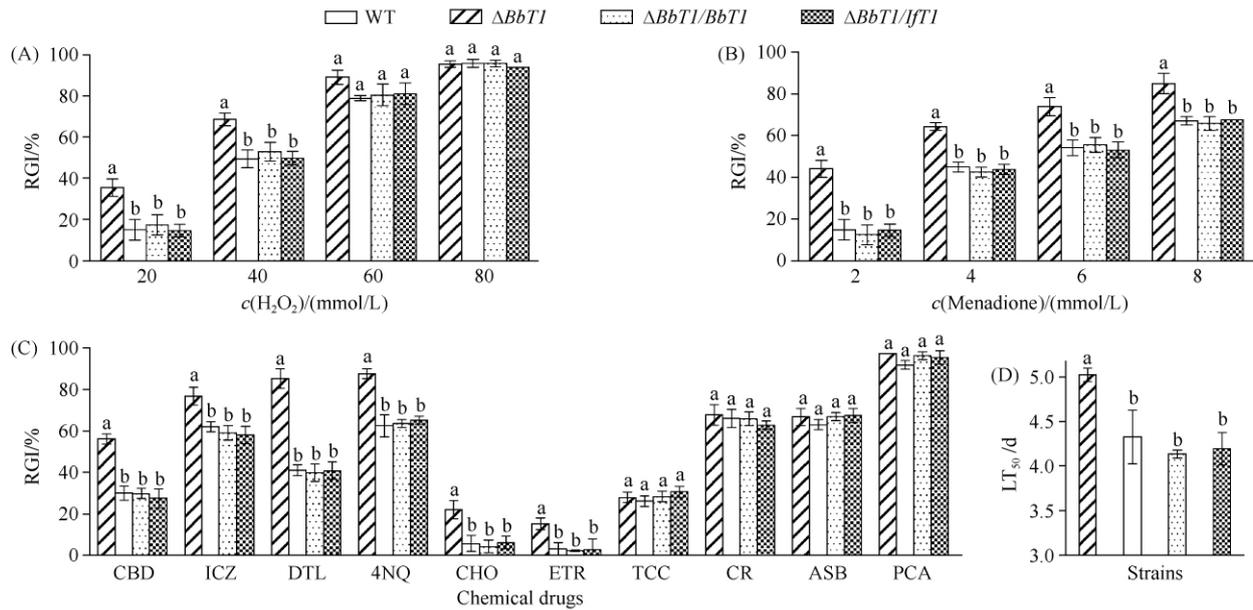


图2 野生株 *Bb2860* (WT)、敲除株  $\Delta BbT1$ 、回补株  $\Delta BbT1/BbT1$  和异源重组株  $\Delta BbT1/Ift1$  的表型比较。

Fig. 2 Comparisons of phenotypes among *Bb2860* (WT),  $\Delta BbT1$ ,  $\Delta BbT1/BbT1$  and  $\Delta BbT1/Ift1$ . (A) – (C) Relative growth inhibition (RGI) of fungal colonies after 6-day growth at 25°C on the plates of SDAY supplemented with  $H_2O_2$  (20–80 mmol/L), menadione (2–8 mmol/L) and one of 10 chemical drugs (CBD: carbendazim; ICZ: itraconazole; DTL: dimetachlone; 4NQ: 4-nitroquinoline N-oxide; CHO: cycloheximide; ETR: ethirimol; TCC: tricyclazole; CR: Congo red; ASB: azoxysyrobim; PCA: phenazino-4-carboxylic acid), respectively. (D) Median lethal times ( $LT_{50}$ ) of different fungal strains against the second-instar larvae of *S. litura*. Different lowercase letters on the bars of each group denote significant differences among the tested strains (Tukey's HSD,  $P < 0.05$ ). Error bars: SD of the mean from three repeated assays.

### 3 讨论

以上结果表明,球孢白僵菌 *BbT1* 与玫烟棒束孢 *Ift1* 作为同源的 ABC 转运蛋白,不仅结构相似,而且功能一致。由于玫烟棒束孢迄今尚无正向遗传操作实例的报道,本研究将其在球孢白僵菌 *BbT1* 敲除株中异源表达,得到与 *BbT1* 回补株及白僵菌野生株完全一致的表型结果,从而有效证明了这一同源基因在两种生防真菌中扮演相同的角色。

从表型变化看,*BbT1* 与 *Ift1* 对十种不同类型化学药物反应是一致的,即对杀菌剂多菌灵、伊曲康唑、菌核净、放线菌酮、乙嘧酚和防腐剂 4-硝基喹啉 N-氧化物表现 28%–4.7 倍的抗药性,而对三环唑、嘧菌酯、啞嗪霉素及刚果红则无显著反应。此外,二者对过氧化氢和甲萘醌不同程度的氧化胁迫也表现出一致的反应,回补株或异源重组株均比敲除株更耐氧化胁迫。这些表型变化表明,*BbT1* 与 *Ift1* 在球孢白僵菌和玫烟棒束孢中确实分别扮演着多药抗性的决定性角色。

有趣的是,在标准化的生测中,回补株、异源重组株及野生株对斜纹夜蛾二龄幼虫的毒力也是一致的,且显著高于敲除株的毒力 20% 左右。这与各菌株抗氧化胁迫能力的大小是一致的。这是因为生防真菌抗氧化胁迫能力越强,越能克服侵染过程中寄主防御反应产生的过氧化物<sup>[16, 22–23]</sup>。

### 参考文献

- [1] Higgins CF. ABC Transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1992, 8: 67–113.
- [2] Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 2001, 11 (7): 1156–1166.
- [3] Wolfger H, Mamnun YM, Kuchler K. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Research in Microbiology*, 2001, 152 (3/4): 375–389.
- [4] Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, ColladoVides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. The complete

- genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277 (5331): 1453-1462.
- [5] Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, 71: 537-592.
- [6] Lage H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2003, 22 (3): 188-199.
- [7] Hirose E, Neves PMO, Zequi JAC. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2001, 44 (4): 419-423.
- [8] Kiso T, Fujita KI, Ping X, Tanaka T, Taniguchi M. Screening for microtubule-disrupting antifungal agents by using a mitotic-arrest mutant of *Aspergillus nidulans* and novel action of phenylalanine derivatives accompanying tubulin loss. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48 (5): 1739-1748.
- [9] Ma ZH, Yoshimura MA, Michailides TJ. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (12): 7145-7152.
- [10] Ma ZH, Yoshimura MA, Michailides TJ. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Management Science*, 2005, 61 (5): 449-457.
- [11] Yan K, Dickman MB. Isolation of a beta-tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (8): 3053-3056.
- [12] Zou G, Ying SH, Shen ZC, Feng MG. Multi-sited mutations of beta-tubulin are involved in benzimidazole resistance and thermotolerance of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (12): 2096-2105.
- [13] Song TT, Ying SH, Feng MG. High resistance of *Isaria fumosorosea* to carbendazim arises from the overexpression of an ATP-binding cassette transporter (ift1) rather than tubulin mutation. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 112 (1): 175-184.
- [14] Xiao GH, Ying SH, Zheng P, Wang ZL, Zhang SW, Xie XQ, Shang YF, Zheng HJ, Zhou Y, St Leger RJ, Zhao GP, Wang CS, Feng MG. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 2012, 2: 483; DOI: 10.1038.srep00483.
- [15] 宋婷婷. 害虫生防真菌多药抗药性与侵染褐飞虱的高毒力菌株筛选策略研究. 浙江杭州: 浙江大学博士学位论文, 2011.
- [16] Zhou G, Jie Wang J, Qiu L, Feng MG. A Group III histidine kinase (mhk1) upstream of high-osmolarity glycerol pathway regulates sporulation, multi-stress tolerance and virulence of *Metarhizium robertsii*, a fungal entomopathogen. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 (3): 817-829.
- [17] Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1985, 1 (1): 17-20.
- [18] Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, Hooykaas PJ. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 1995, 14 (13): 3206-3214.
- [19] Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ. *Agrobacterium-mediated* transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols*, 2008, 3 (10): 1671-1678.
- [20] Fang WG, Zhang YJ, Yang XY, Zheng XL, Duan H, Li Y, Pei Y. *Agrobacterium tumefaciens-mediated* transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2004, 85 (1): 18-24.
- [21] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社, 2002.
- [22] Wang ZL, Zhang LB, Ying SH, Feng MG. Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. *Environmental Microbiology*, 2012, DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02848.x.
- [23] Xie XQ, Li F, Ying SH, Feng MG. Additive contributions of two manganese-cored superoxide dismutases (MnSODs) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *PLoS One*, 2012, 7 (1): e30298.

# Antioxidation and multidrug resistance of structure-similar ATP-binding cassette transporter proteins in two fungal entomopathogens

Jing Zhao, Tingting Song, Shenghua Ying, Mingguang Feng\*

Institute of Microbiology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

**Abstract:** [Objective] Structure-similar ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins, BbT1 in *Beauveria bassiana* (Bb) and IfT1 in *Isaria fumosorosea* (If), were characterized. [Methods] Various phenotypes including cellular antioxidant response, multidrug resistance and virulence were compared between wild-type strain and the constructed mutants  $\Delta BbT1$ ,  $\Delta BbT1/BbT1$  and  $\Delta BbT1/IfT1$ . [Results] Compared with the wild-type,  $\Delta BbT1/BbT1$  and  $\Delta BbT1/IfT1$  strains showing no significant changes in examined phenotypes,  $\Delta BbT1$  became 27% to 2.1-fold less tolerant to the oxidative stress of 20–40 mmol/L  $H_2O_2$  and 2–8 mmol/L menadione, 28% to 4.7-fold less resistant to carbendazim, itraconazole, dimetachlone, cycloheximide, ethirimol and 4-nitroquinoline N-oxide, and about 20% less virulent to the second-instar larvae of *Spodoptera litura*. [Conclusion] The ABC transporter proteins BbT1 and IfT1 are similar not only in sequence structure but also in biological function, act as one of the determinants for the multidrug resistance of Bb and If, and also contribute to the fungal virulence due to involvement in cellular antioxidant response.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, ATP-binding cassette transporter protein, gene expression, multidrug resistance, antioxidation, virulence

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Major Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2009CB118904) and by the National Natural Science Foundation of China (30930018, 30971960)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-88201978; E-mail: mgfeng@zju.edu.cn

Received: 11 August 2012 / Revised: 17 October 2012

## 1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

### 《微生物学报》刊、期统计表

2013 年 1 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 – 1956	半年刊	1 – 4	1 – 2
1957 – 1958	季刊	5 – 6	1 – 4
1959	季刊	7	1 – 2
1959 – 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 – 4
1963 – 1965	季刊	9 – 11	1 – 4
1966	季刊	12	1 – 2
1966 – 1972	停刊 6 年半		
1973 – 1988	季刊	13 – 28	1 – 4
1989 – 2007	双月刊	29 – 47	1 – 6
2008 – 2012	月刊	48 – 52	1 – 12
2013	月刊	53	1