

球孢白僵菌不同分生孢子特异性表达蛋白分析与筛选

张佳诗, 徐文静, 杜 茜, 隋 丽, 赵 宇, 张正坤*, 李启云*

(农业部东北作物有害生物综合治理重点实验室/吉林省农业微生物重点实验室/吉林省农业科学院植物保护研究所, 吉林 公主岭 136100)

摘 要:对球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* (Bais.)Vuill)D1-5 菌株的3种分生孢子气生孢子、芽生孢子和深层孢子进行电镜观察,并利用双向凝胶电泳技术对3种孢子的特异性表达蛋白进行分析与筛选。结果显示,电镜下气生分生孢子呈球形,外周有棒状结构包裹,具有明显的疏水特性;芽生孢子为圆柱形,大小不均一,表面光滑;深层孢子球形透明,大小均一,表面粗糙,3种分生孢子孢子壁厚度差异不明显。经双向凝胶电泳对3种分生孢子进行特异性表达蛋白分离后,使用PDquest软件对结果进行分析,深层分生孢子与芽生分生孢子蛋白表达图谱相比较,有20个蛋白质表达量发生2倍以上改变,其中8个蛋白质表达量上调,12个蛋白质表达量下调;气生分生孢子与芽生分生孢子蛋白表达图谱相比较,有57个蛋白质表达量发生2倍以上改变,其中43个蛋白质表达量上调,14个蛋白质表达量下调;深层分生孢子与气生分生孢子蛋白表达图谱相比较,有66个蛋白质表达量发生2倍以上改变,其中8个蛋白质表达量上调,58个蛋白质表达量下调。

关键词:球孢白僵菌;孢子形态;电镜观察;双向电泳;特异性蛋白

中图分类号:S482.3⁺9

文献标识码:A

文章编号:1003-8701(2016)05-0083-05

Analysis and Screening of Specific Expression Protein of Different Morphological Spores of *Beauveria bassiana*

ZHANG Jiashi, XU Wenjing, DU Qian, SUI Li, ZHAO Yu, ZHANG Zhengkun*, LI Qiyun*

(Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast of Ministry of Agriculture/Jilin Key Lab of Agricultural Microbiology/Plant protection institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: The aerial conidias, in vitro blastspores and submerged conidias of *Beauveria bassiana* D1-5 strain were observed by electron microscope, respectively, their specific expression protein were analyzed and screened via two-dimensional electrophoresis. The results indicated that aerial conidias was spherical, packaged by rod like structure, gave an obviously hydrophobic property. In vitro blastspore showed cylindrical, unequal in size, and smooth surface. Submerged conidia was transparent sphere, equal in size, and a rough surface, the wall of three kinds of spores showed a similar thickness. PDquest software was used to analyze data, after isolation of specific expression protein of three kinds of spores by two-dimensional electrophoresis. Comparison of in vitro blastspores and submerged conidias indicated that there were 8 up-regulated and 12 down-regulated proteins among 20 points gave more than two times change. Comparison of aerial conidias and in vitro blastspores indicated that there were 43 up-regulated and 14 down-regulated proteins among 57 points gave more than two times change. Comparison of aerial conidias and submerged conidias indicated that there were 8 up-regulated and 58 down-regulated proteins among 66 points gave more than two times change.

Key words: *Beauveria bassiana*; Spore morphology; Electron microscope; Two-dimensional electrophoresis; Specific expression protein

收稿日期:2016-05-09

基金项目:吉林省科技厅青年基金项目(20130522080JH);吉林省科技厅重点项目(20150204015NY);吉林省重大科技攻关专项(20140203006NY);吉林省农业科学院创新工程项目(c62150805)

作者简介:张佳诗(1983-),男,助理研究员,硕士,研究方向为生物农药。

通讯作者:张正坤,男,博士,副研究员,E-mail:zhangzhengkun1980@126.com

李启云,男,博士,研究员,E-mail:qyli@cjaas.com

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* (Bais.)Vuill)具有杀虫谱广泛,环境安全性好等特点,是一种在世界范围内广泛应用的广谱性虫生真菌^[1-3]。球孢白僵菌在其生活史至少会产生3种繁殖体,分别称为气生孢子(aerial conidia)、芽生孢子(in vitro blastspores)及深层孢子(submerged conidia),分别具有不同的生理生化特性、表面及内部形态以及生物学功能^[4]。其中气生孢子普遍具有侵染性,是白僵菌固体发酵的主要孢子形态,也是目前生产中广泛应用的白僵菌制剂原料,而芽生孢子和深层孢子是白僵菌在液体发酵过程中主要的发育形态^[5-6]。3种孢子形态不同,生物学功能也存在着差异,对球孢白僵菌在发酵生产、杀虫机理等方面存在影响。

生物体内的蛋白质通过单独表达或相互作用决定了生物体的形态和功能^[7-8]。分析蛋白质的表达形式、形状、结构和功能对阐明基因如何决定生物的表型和互作有着十分重要的意义^[9],白僵菌不同孢子形态存在不同的蛋白组成形式和表达量,不仅影响了其外部形态和生长发育,也是影响其繁殖和杀虫机理的主要因素。

为了进一步明确其形态及组成结构,本研究利用扫描电镜对其进行表面形态及内部结构观察,并利用双向电泳技术对蛋白质组成进行分离和分析,有助于明确其形态学功能和蛋白质功能,为球孢白僵菌制剂生产应用及杀虫机理研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株:球孢白僵菌 D1-5 菌株,由本实验室分离自吉林省德惠市田间亚洲玉米螟幼虫僵虫并用沙土管保存。

培养基:PDA 固体培养基、TKI broth 液体培养基和 SDY 液体培养基分别用于培养气生孢子、芽生孢子和深层孢子。

双向电泳:固相 pH 梯度缓冲液、固相 pH 梯度干胶条、二硫苏糖醇、CHAPS 均购自 Bio-Rad 公司。超纯尿素、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、EDTA、Tris 购自 Amresco。甘氨酸、过硫酸铵、Tris 饱和酚购自 BBI。 β -巯基乙醇、四甲基乙二胺购自 Sigma 公司。其他化学试剂均为分析纯,购自北京化工厂。

1.2 实验方法

1.2.1 3种分生孢子的培养及收集

将沙土管保存的 D1-5 菌株在 PDA 培养基上划线 26℃ 培养 10 d 左右,用接菌铲将孢子粉刮入无菌的培养皿中。在 TKI broth 液体培养基及 SDY 液体培养基中接种 26℃, 180 r/min 摇床培养 48 h,在无菌条件下分别进行过滤,然后将滤液中的孢子 8 000 r/min 转速下离心 5 min,弃上清,取沉淀保存备用。

1.2.2 3种分生孢子电镜观察

按照常规扫描电镜方法进行操作。少量3种分生孢子经固定、脱水、干燥后将样品放在真空镀膜机内,镀膜样品在扫描电镜中进行观察;将脱水后的孢子多孔橡胶包埋烘干,使用机械推进式切片机切片,放在有支持膜的载网上,柠檬酸铅染色 10 ~ 20 min。

1.2.3 3种分生孢子蛋白质提取及纯化

将3种分生孢子收集后,各取0.1 g进行蛋白质提取及纯化,参照 Guozheng 等^[10]进行。

1.2.4 双向电泳

将提取好的3种分生孢子总蛋白质分别进行第一向等电聚焦及第二向 SDS-PAGE 电泳,方法参照殷波^[11]研究进行。

1.2.5 特异性蛋白数据采集及分析

将双向电泳后的凝胶经银染显色后用 Artix-can 1010 Microtek 扫描后获取图像,用 PDQuest 分析软件对图像进行背景消减、斑点检测、匹配和获取斑点位置坐标等分析。

2 结果与分析

2.1 分生孢子表面形态的电镜观察

球孢白僵菌 D1-5 的气生分生孢子经扫描电镜放大 5 000 倍照片显示,其外部形态呈卵圆形,菌丝细长(图 1a),与深层分生孢子外形较为相似(图 1c)。芽生分生孢子为棒状结构,孢子外壁光滑,外形与其他两种分生孢子有明显的区别(图 1b)。深层分生孢子为球形透明,孢子表面粗糙,有绒毛状结构(图 1c)。

2.2 分生孢子切片电镜观察

3种分生孢子经切片并在扫描电镜下放大 25 000 倍观察(图 2),3种分生孢子孢子壁厚度差异不明显,气生孢子外层细胞壁较为光滑,且疏水明显(图 2a);芽生孢子外壁也较为光滑,但未表现出明显的疏水性(图 2b);而深层孢子外壁带有绒毛状结构,可能与其亲水性相关(图 2c)。

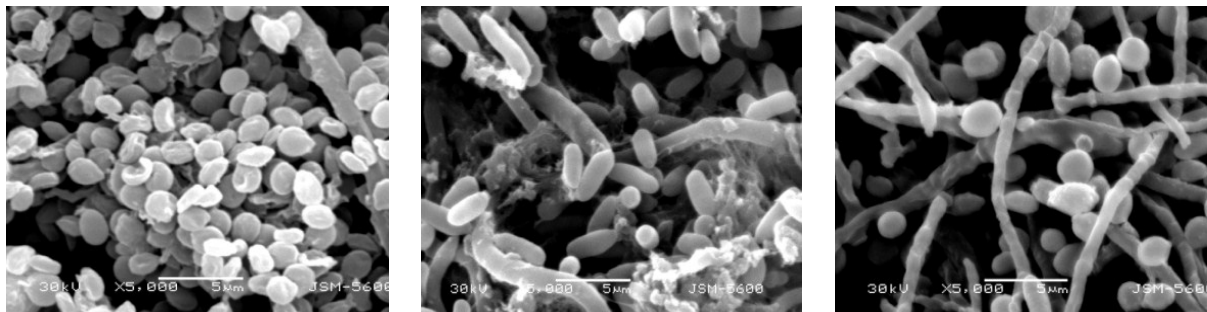


图1 3种分生孢子放大5 000倍时表面扫描电镜照片
a为气生分生孢子,b为芽生分生孢子,c为深层分生孢子,下同



图2 3种分生孢子放大25 000倍时切片扫描电镜照片

2.3 3种分生孢子蛋白质特异性表达

扫描电镜下分别对3种孢子进行外部形状及表面形态的观察,由于其不同培养环境下形成的外部形态可能影响孢子的亲水性,这种外部形态的表现是由其蛋白质表达差异造成的。因此,利用双向电泳技术及PDquest软件对3种孢子特异性表达蛋白进行两两比较分析,对差异表达蛋白点进行标注,获得孢子之间表达差异的特异性蛋白位点。

2.3.1 深层分生孢子与芽生分生孢子蛋白表达图谱分析

深层分生孢子与芽生分生孢子的双向凝胶电泳图谱(图3)分析结果显示,深层分生孢子与芽生分生孢子蛋白表达图谱相比较,有20个蛋白质

表达量发生2倍以上改变,其中9个蛋白质表达量下调,11个蛋白质表达量上调,3号和5号蛋白差异最为明显,为特异表达蛋白。二者之间的差异表达蛋白相对较少,分析可能与两种分生孢子均使用液体培养基培养有关,培养环境决定了蛋白质表达。

2.3.2 气生分生孢子与芽生分生孢子蛋白表达图谱分析

气生分生孢子与芽生分生孢子的双向凝胶电泳图谱分析结果(图4)显示,气生孢子与芽生孢子差异比较明显,差异相对较大,有57个蛋白质表达量发生2倍以上改变,14个蛋白质表达量上调,43个蛋白质表达量下调,其中1号、3号、6号、50号、60号差异最为明显,为特异表达蛋白。

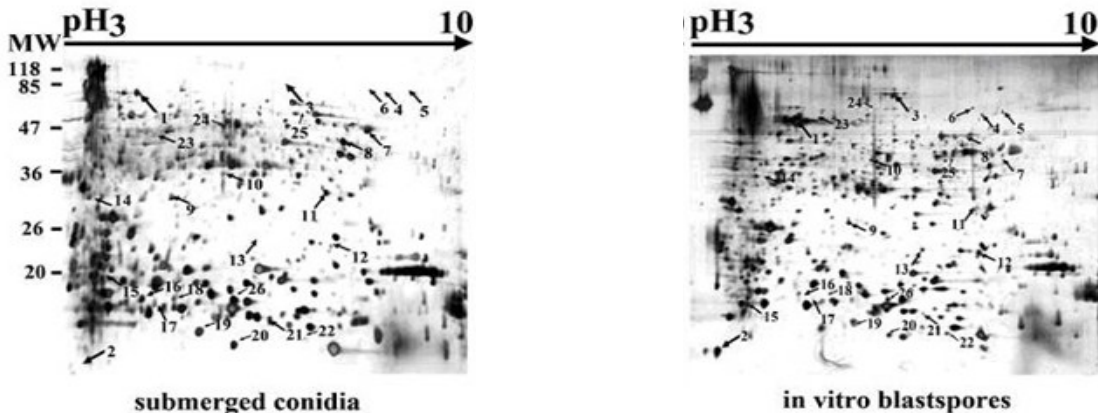


图3 深层分生孢子与芽生分生孢子蛋白表达图谱

2.3.3 深层分生孢子与气生分生孢子蛋白表达图谱分析

由深层分生孢子与气生分生孢子的双向凝胶电泳图谱分析结果(图5)可知,深层孢子与气生孢子差异最为显著。二者蛋白表达图谱相比较,

有66个蛋白质表达量发生2倍以上改变,有8个蛋白质表达量下调,58个蛋白质表达量上调。其中27号、37号、38号、39号、53号差异最为明显,为特异表达蛋白。

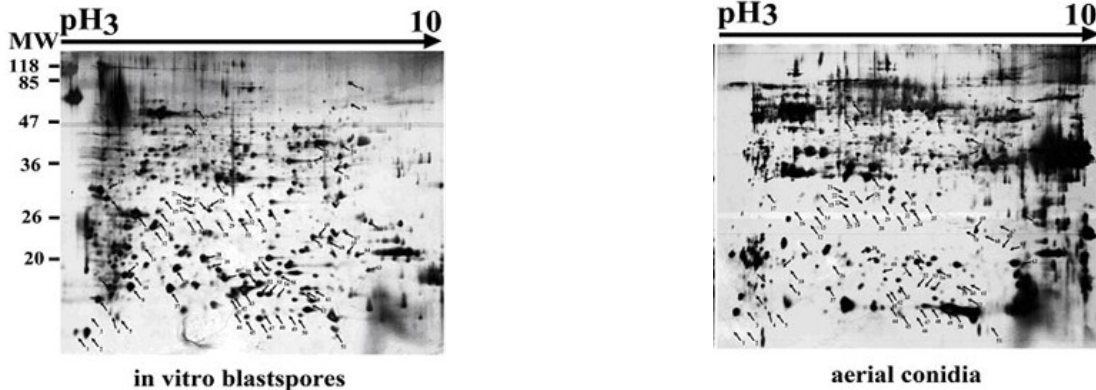


图4 气生分生孢子与芽生分生孢子蛋白表达图谱

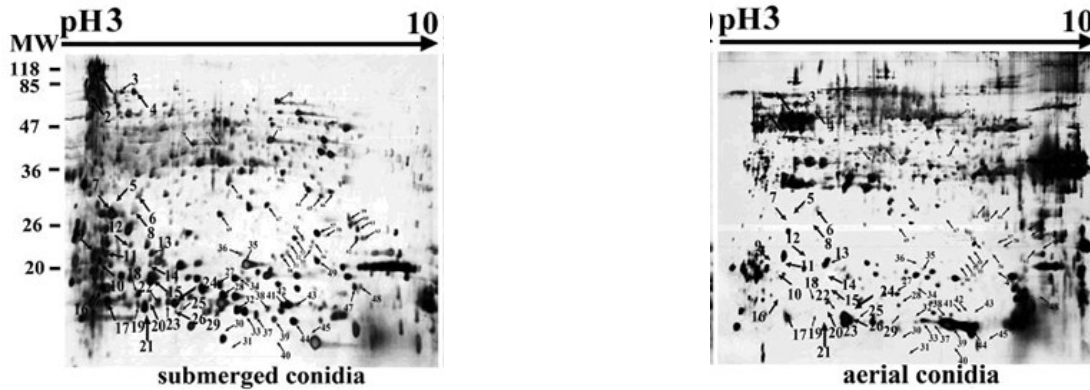


图5 深层分生孢子与气生分生孢子蛋白表达图谱

3 讨论

作为一种广泛应用的真菌杀虫剂,球孢白僵菌在田间防治过程中,多采用固体发酵或固液两相发酵方法制备气生分生孢子,加工成粉剂或液剂,但同时存在着在开放环境下容易被污染等瓶颈问题^[12-13]。采用液体发酵方法生产芽生孢子及深层孢子,可以避免污染,具有亲水性,生产条件相对可控,并且更易加工成水剂剂型,但存在毒力低于气生孢子的问题。为明确其亲水性形成及发育机理,本研究对球孢白僵菌D1-5 3种分生孢子进行表面形态及切片电镜扫描观察,发现尽管气生分生孢子和芽生分生孢子均具有光滑表面,但亲水性不同,而深层孢子的亲水性可能是由于其表面绒毛状结构造成。3种孢子可能是由于其在不同培养环境下蛋白质表达差异造成其外部形态的差异,从而影响了其亲水性。

发掘与球孢白僵菌不同分生孢子外部形态构

成及在不同培养环境下发育相关的特异性表达蛋白,能够进一步明确3种分生孢子生长发育差异产生机理。将收集到的球孢白僵菌不同类型分生孢子进行差异表达蛋白分析发现,芽生孢子与深层孢子之间的差异表达蛋白相对较小,这可能与这两种孢子培养环境有关。由于芽生分生孢子与深层分生孢子外观形态有明显区别,且深层分生孢子致病力比芽生分生孢子强,可以推测在差异表达蛋白中应包含分生孢子形态形成相关的蛋白;在芽生孢子与深层孢子分别与气生分生孢子进行比较时发现孢子之间的差异表达蛋白较多,深层分生孢子虽然与气生分生孢子具有相似的表面形态,但孢子壁内部不同蛋白组成和表达量也存在着明显差异。

在进一步的工作中,将继续对这3种孢子之间的差异表达蛋白进行分离纯化,并结合质谱分析,以期最终获得与球孢白僵菌毒力、生理生化特性以及遗传发育的相关蛋白,为球孢白僵菌杀虫机理及定向育种研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] Shevchenko A, Sunyaev S, Loboda A, et al. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-Quadrupole time of flight mass spectrometry and blast homology searching [J]. Anal. Chem., 2001, 73: 1917-1926.
- [2] 武海峰, 解 娇, 张正坤, 等. 白僵菌悬浮剂研制及其对玉米螟防治研究[J]. 玉米科学, 2014, 22(4): 140-146.
- [3] 徐文静, 尹唯凰, 张正坤, 等. 防治玉米螟高效球孢白僵菌新菌株筛选[J]. 吉林农业科学, 2011, 36(4): 41-44.
- [4] Facius A, Englbrecht C, Birzele F, et al. PRIME: A graphical interface for integrating genomic/proteomic databases[J]. Proteomics, 2005(5): 76-80.
- [5] Rombach M C. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged cultures [J]. Entomophaga, 1989, 34: 45-52.
- [6] Hegedus D D, Bidochka M J, Khachatourians G G. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in defined medium containing chitin. Two hexosamines or glucose[J]. Appl Microbiol Biot., 1990(33): 641-647.
- [7] 林均安, 高锦梁, 洪 键. 实用生物电子显微技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989: 35.
- [8] 田中敬一, 永谷隆. 图解扫描电子显微镜-生物样品制备[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 67.
- [9] 周德山, 蔡文琴. 扫描电镜特殊制片技术[J]. 电子显微学报, 1991, 10(2): 148-152.
- [10] Guozheng Q, Shiping T, Zhulong Ch, et al. Crucial Role of Antioxidant Proteins and Hydrolytic Enzymes in Pathogenicity of *Penicillium expansum*[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2007 (6): 425-438.
- [11] 殷 波. 蝉蜕诱导球孢白僵菌产孢相关蛋白质差异表达分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008.
- [12] 徐庆丰, 宋益良, 杜长喜, 等. 中国虫生真菌研究与应用[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997: 121.
- [13] Jenkins N E, Goettel M S. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts[J]. Mem Entomol Soc Can., 1997, 171: 37-48.

(责任编辑: 王 昱)

《东北农业科学》征订启事

《东北农业科学》(原《吉林农业科学》)是吉林省农业科学院主办的农业综合类学术期刊。本刊融学术性、技术性、信息性和知识性于一体,是理论与实践相结合、普及与提高并重的刊物。旨在报道最新农业科研成果、研究进展和科技动态,传播农业科学知识,推广农业新品种和新技术,介绍农业生产新经验等。辟有作物育种栽培、生物技术、土壤肥料、植物保护、畜牧兽医、园艺果树、农业经济和农产食品加工等栏目。

本刊是中国科技论文统计源期刊、中国期刊全文数据库全文收录期刊、中国核心期刊(遴选)数据库期刊、中文科技文献检索权威期刊、中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊,2004年获全国优秀农业期刊奖,2006年获第五届全国农业期刊金犁奖学术类二等奖。《东北农业科学》面向全国公开发行,主要为各图书情报部门的中文期刊采购和读者需求服务,为广大农民朋友、农业科研人员、农业技术推广人员、农业生产管理者和农业院校师生服务。

《东北农业科学》为双月刊,逢双月25日出版,刊号: CN22-1376/S,大16开112页,每期定价8.00元,全年48.00元。邮发代号: 12-71,全国各地邮局(所)均可订阅,漏订者亦可随时向本刊编辑部订阅,不另收邮费。

地 址: 吉林省长春市生态大街1363号《东北农业科学》编辑部 邮 编: 130033

电 话: 0431-87063151 E-mail: jlnyxx@163.com jlnyxx@cjaas.com