

2 株蜡蚧轮枝菌耐热性差异分析

谷祖敏 戈婉儿 纪明山

沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866

摘要 采用菌丝生长速率法和孢子萌发法比较蜡蚧轮枝菌不同菌株 VL17 和 VL18 菌株菌丝和分生孢子耐热性的差异, 喷雾接菌法测定两菌株高温胁迫下的杀蚜毒力, qPCR 法研究高温胁迫后热激蛋白 *sHsp* 和 *Hsp70* 基因的表达量, 初步探索热激蛋白抗高温胁迫的作用机制。结果显示, VL18 菌株菌丝和分生孢子对高温的耐受性显著好于 VL17 菌株, 34 °C 时 VL18 菌株的菌落直径比 VL17 大 63.16%, 37 °C 时 VL18 分生孢子萌发率比 VL17 高 103%; 温度高于 31 °C 时两者的杀蚜活性差异显著, 37 °C 时 VL18 对蚜虫的校正死亡率比 VL17 高 166.67%; 42 °C 时胁迫相同时间, VL18 的 *sHsp* 和 *Hsp70* 基因表达量均高于 VL17, 胁迫 120 min 时 VL18 的 *Hsp70* 和 *sHsp* 基因表达量分别是 VL17 的 16.97 倍和 63.74 倍。两菌株 *sHsp* 基因的表达量均明显高于 *Hsp70* 基因。通过比较分析认为小分子热激蛋白 *sHsp* 对蜡蚧轮枝菌抗高温胁迫起重要作用。

关键词 蜡蚧轮枝菌; 高温胁迫; 热激蛋白

中图分类号 S 476.12 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)05-0040-05

蜡蚧轮枝菌 (*Lecanicillium lecanii*) 是一种重要昆虫病原真菌^[1-2], 能寄生于同翅目、鳞翅目、缨翅目等昆虫, 用于防治温室蔬菜及花卉上的一些害虫如白粉虱、蚜虫、蓟马、线虫等^[3-6]。英国最早对蜡蚧轮枝菌的制剂进行登记注册, 由此开始蜡蚧轮枝菌的商品化进程^[7]。菌株对高温的耐受力是影响活体真菌制剂稳定性的重要因素之一。环境温度直接影响活体真菌制剂的生产加工、货架期和田间杀虫效果^[8]。

生物体受到外界高温胁迫时, 会通过开启某些基因的表达来应对胁迫, 减少损害, 维持基本生理代谢水平。其中, 最显著的变化是合成热激蛋白 (heat shock protein, Hsp)^[9]。国内外对热激蛋白的研究大多集中在昆虫和植物方面^[10-11], 关于虫生真菌方面只有少量研究, 如球孢白僵菌 *Hsp70* 基因^[12-13]。笔者在比较蜡蚧轮枝菌 VL17、VL18 菌株的菌丝、分生孢子以及杀蚜活性对高温耐受性差异的基础上, 进而比较两菌株高温胁迫后 *sHsp* 和 *Hsp70* 基因表达量的差异, 分析热激蛋白与蜡蚧轮枝菌耐热的相关性, 探索热激蛋白在蜡蚧轮枝菌抗高温胁迫中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

蜡蚧轮枝菌 VL17, 分离自辽宁新民罹病桃蚜 (*Myzus persicae*); VL18 分离自湖北武汉烟粉虱 (*Bemisia tabaci*)。

1.2 供试培养基

PDA 培养基, 用于扩繁培养蜡蚧轮枝菌。

1.3 供试昆虫

萝卜蚜 (*Lipaphis erysimi*), 采自沈阳农业大学后山大棚甘蓝 (*Brassica oleracea* L.), 室内饲养 1 周后用于生测。

1.4 蜡蚧轮枝菌孢子悬浮液的制备

将蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 菌株活化后, 接于 PDA 培养基中央, 25 °C 培养 14 d, 加入含 0.5% 吐温 80 的无菌水 5 mL, 轻轻刮下培养基表面的孢子和菌丝, 用双层纱布过滤除去菌丝, 获得蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 的孢子悬浮液。

1.5 蜡蚧轮枝菌菌丝耐热性的测试

分别取直径 5 mm 的蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 菌饼, 接入 PDA 平板中央, 分别置于 25、28、

31、34 和 37 °C 培养箱中, 每个处理 3 次重复。10 d 后测量菌落直径。比较相同温度下两菌株菌落直径的差异。

1.6 蜡蚧轮枝菌分生孢子耐热性的测试

分别取 20 μL 蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 的孢子悬浮液滴于凹玻片上, 然后将其置于 25、28、31、34 和 37 °C 培养箱中保温保湿培养, 24 h 后调查萌发孢子数, 统计孢子萌发率, 每个处理 3 次重复。比较相同温度下两菌株分生孢子萌发率的差异。

1.7 不同温度下蜡蚧轮枝菌杀蚜活性的测定

将蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 的孢子悬浮液稀释到 1 × 10⁶/mL, 挑选长势一致的 2 龄若蚜, 每个处理 30 头, 喷雾接菌后转移到新鲜甘蓝叶片上, 分别置于 25、28、31、34 及 37 °C 的培养箱中。7 d 后调

查死亡虫数, 死亡试虫通过保湿培养验证是否为蜡蚧轮枝菌感染, 比较相同温度下两菌株杀蚜毒力的差异。

1.8 蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 高温胁迫后热激蛋白基因表达量的比较

蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 两个菌株经 42 °C 热激 15、30、60、120 min 后进行 RNA 抽提, 以 RNA 为模板反应合成 cDNA, 引物设计如表 1 所示, GAPDH 作为内参基因, 用于实时定量 PCR。PCR 反应体系: 5 μL Master Mix, 0.5 μL 模板 DNA, 0.1 μL 引物, 加 ddH₂O 至 10 μL。PCR 扩增条件参照 TaKaRa 公司 PrimeScriptRT-PCR Kit 试剂盒说明书。采用 2^{-ΔΔCT} 方法评价目的基因的相对表达量。

表 1 qPCR 所使用的引物及序列

Table 1 Primers used for qPCR

引物名称 Primer name	序列 Primer sequence	引物类型 Primer type
RJ-GAPDH-F	CCCCAAACACCTCATCTCA	定量 PCR 内参引物 Endogenous reference genes primer
RJ-GAPDH-R	ATGCCAACCTTGACGGGAG	
<i>Hsp70</i> F	CCTCTGTGCGTCCATGAAATC	<i>Hsp70</i> 定量 PCR 引物 PCR primer for <i>Hsp70</i>
<i>Hsp70</i> R	GCCATTGCTGTATCCACTCA	
<i>sHsp</i> F	TGACGCAAAAGAACACGACG	<i>sHsp</i> 定量 PCR 引物 PCR primer for <i>sHsp</i>
<i>sHsp</i> R	TCTCAAGCCCTGCTGGAAG	

1.9 统计方法

数据结果采用 SPSS 软件进行方差分析, 以 Duncan's 新复极差法进行显著性检验, 以 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 菌丝耐热性比较

由表 2 可知, 蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 菌株在 25~28 °C 生长速度较快, 菌落直径较大, 随温度升高生长速度减慢, 当温度达到 37 °C, 菌丝均基本停止生长, 菌落直径为原始菌饼直径。两者菌丝对高温的耐受性明显不同。25 °C 时两菌株菌落直径不存在显著差异。28~34 °C, VL18 菌株的菌落直径显著大于 VL17 菌株, 说明蜡蚧轮枝菌 VL18 菌丝比 VL17 耐热性更好, 而且随温度升高耐热性差异越明显。28 °C VL18 菌株的菌落直径比 VL17 菌株大 9.25%, 温度升高至 34 °C, VL18 菌株的菌落直径比 VL17 菌株大 63.16%。

表 2 VL17 和 VL18 菌株不同温度下的菌落直径

Table 2 Colony diameter of VL17 and VL18 under different temperature

温度/°C Temperature	菌落直径/cm Colony diameter		增长率/% Increasing rate
	VL17	VL18	
25	4.10 ± 0.08a	4.27 ± 0.10a	4.15
28	2.92 ± 0.07b	3.19 ± 0.21a	9.25
31	1.08 ± 0.10b	1.42 ± 0.06a	31.48
34	0.57 ± 0.04b	0.93 ± 0.06a	63.16
37	0.50 ± 0.01a	0.50 ± 0.00a	0.00

注: 同行数据后标不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检验在 5% 水平差异显著。下同。Note: Different letters in the same line show significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test. The same as follows.

2.2 蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 分生孢子耐热性比较

由表 3 可知, 25~37 °C 范围内, 蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 菌株的分生孢子均能萌发, 25~28 °C 萌发率较高, 随温度升高, 孢子萌发率下降。和 VL17 菌株相比, 蜡蚧轮枝菌 VL18 菌株的分生

孢子更耐高温,在温度超过 31 ℃时孢子萌发率显著高于 VL17 菌株,温度越高,差异越显著。37 ℃ VL18 菌株分生孢子萌发率比 VL17 菌株高 103%。

表 3 VL17 和 VL18 菌株不同温度下的孢子萌发率

温度/℃ Temperature	孢子萌发率 Conidia germination rate		增长率 Increasing rate
	VL17	VL18	
25	87.68±2.08a	89.71±1.69a	2.32
28	89.26±2.49a	91.83±1.98a	2.88
31	70.93±3.99b	83.54±2.77a	17.78
34	42.47±1.74b	56.25±2.71a	32.45
37	17.35±3.05b	35.22±0.97a	103.00

2.3 蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 不同温度下杀蚜活性的比较

由表 4 可知,蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 在不同温度下对蚜虫的毒力不同,28 ℃时两菌株的杀蚜活性最强,VL17 和 VL18 对蚜虫的校正死亡率分别为 81.36%和 83.05%。28~37 ℃范围内,随着温度升高,两菌株对蚜虫的毒力逐渐减小。当温度低于 28 ℃,两菌株的杀蚜活性差异不显著,温度高于 31 ℃时,VL18 菌株对蚜虫的毒力显著高于 VL17,温度越高差异越明显,31 ℃时 VL18 对蚜虫的校正死亡率比 VL17 高 10.57%,37 ℃时 VL18 比 VL17 高 166.67%。

表 4 VL17 和 VL18 菌株不同温度下对蚜虫的校正死亡率

温度/℃ Temperature	校正死亡率 Corrected mortality rate		增长率 Increasing rate
	VL17	VL18	
25	74.32±2.71a	76.97±1.56a	3.57
28	81.36±1.66a	83.05±2.18a	2.08
31	71.43±0.97b	78.98±2.45a	10.57
34	47.75±3.12b	59.22±1.81a	24.02
37	18.18±1.19b	48.48±2.12a	166.67

2.4 蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 菌株 Hsp70、sHsp 高温胁迫后表达量的比较

经 42 ℃ 高温胁迫后,蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 的 *sHsp* 和 *Hsp70* 基因随时间延长的表达规律和表达量明显不同(见图 1、图 2)。VL17 菌株 *sHsp* 和 *Hsp70* 基因随胁迫时间延长表达量小幅度增长,在 60 min 表达量达到高峰,之后表达量逐渐下降。VL18 菌株 *sHsp* 和 *Hsp70* 基因随胁迫时间

延长表达量大幅度增长,一直增长到 120 min 时达到最高峰。胁迫相同的时间,两菌株 *sHsp* 基因的表达量均高于 *Hsp70* 基因。*Hsp70* 和 *sHsp* 基因的相对表达量均随胁迫时间的增多而升高,蜡蚧轮枝菌 VL18 菌株的 *sHsp* 和 *Hsp70* 基因表达量均高于 VL17,而且 *sHsp* 基因表达差异更明显。42 ℃ 高温胁迫 120 min 时 VL18 菌株 *Hsp70* 基因表达量是 VL17 的 16.97 倍,*sHsp* 基因表达量是 VL17 的 63.74 倍。

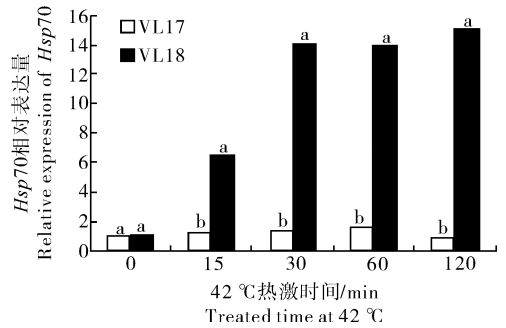


图 1 42 ℃ 胁迫不同时间 *Hsp70* 基因的表达量

Fig.1 Relative expression levels of *Hsp70* treated different time at 42 °C

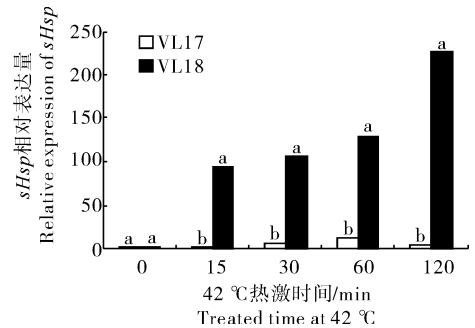


图 2 42 ℃ 胁迫不同时间 *sHsp* 基因的表达量

Fig.2 Relative expression levels of *sHsp* treated different time at 42 °C

3 讨论

不同菌种或同一菌种的不同菌株在抗逆性方面差异较大,一般认为这种差异与菌种的地理来源和原始寄主有关。李鸿文等^[14]研究杀虫真菌球孢白僵菌不同菌株分生孢子的耐热能力,发现寄主和地理来源不同的球孢白僵菌菌株在耐热力方面差异较大。VL17 和 VL18 菌株分别采集自辽宁新民和湖北武汉,两地气候环境尤其温度差别很大,研究结果显示两菌株菌丝和分生孢子对高温的耐受性差异显著,和前人研究结果一致^[14]。耐热性能好的菌株具

备更好的生态适应性和田间应用效果,尤其能应对夏季高温的环境条件^[15]。试验中菌丝和分生孢子耐热性好的 VL18 菌株在温度高于 31 °C 时对蚜虫的毒力显著高于 VL17,证实了这一说法。抗高温胁迫的 VL18 菌株也为深入研究蜡蚧轮枝菌的耐热机制提供了很好的试材。

热激蛋白在生物体中分布普遍。热激蛋白的诱导表达与众多胁迫因子有关,大多数研究表明热激蛋白的诱导表达与生物的热适应能力最为密切^[16]。李静馨等^[17]研究证实热激处理球孢白僵菌后在参与菌体热激响应的基因中,热激蛋白家族成员最多,且响应最快。*Hsps* 在生物体抵抗高温方面具有重要作用,受到热胁迫刺激后,生物体对热胁迫抗性的提高与热激蛋白的表达量普遍成正相关^[18-19]。研究结果显示,对高温耐受性好的蜡蚧轮枝菌 VL18 高温胁迫后 *sHsp* 和 *Hsp70* 基因表达量均高于 VL17,和前人研究结果一致,说明热激蛋白与蜡蚧轮枝菌抗高温胁迫密切相关。

根据分子质量的大小,热激蛋白家族可分为: Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40 及小分子 Hsps^[20]。不同生物体中含有的热激蛋白种类不同,各类热激蛋白的功能既有重叠,也有各自的特殊性。前人研究结果显示不同生物体中参与耐热的热激蛋白种类不同^[21-22]。本研究发现蜡蚧轮枝菌 VL17 和 VL18 菌株 42 °C 高温胁迫后 *sHsp* 基因的表达量均高于 *Hsp70* 基因,而且耐热性能好的 VL18 胁迫 120 min 时的 *Hsp70* 基因表达量仅是 VL17 的 16.97 倍,而 *sHsp* 基因表达量是 VL17 的 63.74 倍,推测小分子热激蛋白 sHsp 对蜡蚧轮枝菌抗高温胁迫起更重要作用。由此可见,不同生物体内由不同的热激蛋白成员发挥作用,来参与生物体抵抗高温胁迫。

参 考 文 献

- [1] MIDORI S, MASANORI K, NAOMI H, et al. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* [J]. *Journal of invertebrate pathology*, 2003, 82: 176-187.
- [2] PAMPAPATHY G, PETER A M, GREGORY S. Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites [J]. *Crop protection*, 2011, 30: 349-353.
- [3] SEPIDEH G, JAVAD K, SHOKOOFEH K, et al. Biocontrol of *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) by *Lecanicillium longisporum* and *Lecanicillium lecanii* under laboratory and greenhouse conditions [J]. *Journal of Asia-Pacific entomology*, 2017, 20: 605-612.
- [4] 刘浩, 张龙, 张宗山. 蜡蚧轮枝菌对枸杞蚜虫的室内毒力和常用药剂敏感性测定 [J]. *中国蔬菜*, 2012(4): 87-90.
- [5] 黄鹏, 余德亿, 姚锦爱, 等. 蜡蚧轮枝菌生物学特性及其与榕母管蓟马毒力的相关性 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2006, 44(11): 172-176.
- [6] 袁盛勇, 闫鹏飞, 孔琼, 等. 蜡蚧轮枝菌对扶桑绵粉蚧的致病性研究 [J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38(4): 748-754.
- [7] HALL R A. A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidiospores on the aphid, *Macrosiphoniella sanbomi* [J]. *Journal of invertebrate pathology*, 1976, 27(1): 41-48.
- [8] WRAIGHT S P, JACKSON M A, KOCK S L. Production, stabilization and formulation of fungal biological agents [M]// BUTT T, JACKSON C, MAGAN N. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. London: CAB International, 2001: 253-287.
- [9] ZHAO L, JONES W A. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses [J]. *Invertebrate survival journal*, 2012, 9: 93-101.
- [10] 单丹, 王利华, 张月亮, 等. 热激蛋白 70 在不同温度胁迫下的差异表达特性研究 [J]. *中国水稻科学*, 2017, 31(5): 533-541.
- [11] AHN Y J, CLAUSSEN K, ZIMMERMAN J L. Genotypic differences in the heat-shock response and thermotolerance in four potato cultivars [J]. *Plant science*, 2004, 166(4): 901-911.
- [12] 谢翎, 陈红梅, 汤强, 等. 实时荧光定量 PCR 检测球孢白僵菌热休克蛋白基因 *HSP70* 在几种胁迫条件下的表达 [J]. *菌物学报*, 2009, 28(6): 806-812.
- [13] 谢翎, 陈红梅, 蒲顺昌, 等. 球孢白僵菌热休克蛋白基因 *BbHsp70* 的 cDNA 及上游序列克隆与分析 [J]. *菌物学报*, 2009, 28(2): 283-288.
- [14] 李鸿文, 冯明光. 球孢白僵菌不同菌株分生孢子的耐热能力 [J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2008, 34(2): 158-162.
- [15] 俞佳, 冯明光. 基于分生孢子热胁迫反应的球孢白僵菌耐热菌株筛选 [J]. *菌物学报*, 2006, 25(2): 278-283.
- [16] SORENSEN J G, KRISTENSEN T N, LOESCHKE V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins [J]. *Ecology letters*, 2003, 6(11): 1025-1037.
- [17] 李静馨, 应盛华, 冯明光. 通过抑制消减杂交技术分离球孢白僵菌热激响应基因 [J]. *中国生物防治学报*, 2011, 27(3): 308-315.
- [18] MARTA M B. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* *HSP70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses [J]. *Journal of plant physiology*, 2010, 167(8): 659-665.
- [19] 郑丹, 崔旭红, 李红亮, 等. 三叶草斑潜蝇 *Hsp70* 的克隆及其表达量在高低温胁迫下的变化 [J]. *植物保护学报*, 2011, 37(2): 159-163.

- [20] PARSELL D A, LINDQUIST S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins[J]. Annual review of genetics, 1993, 27(1): 437-496.
- [21] CHEN H, XU X L, LI Y P, et al. Characterization of heat shock protein 90, 70 and their transcriptional expression patterns on high temperature in adult of *Grapholita molesta* (Busck) [J]. Insect science, 2014, 21(4): 439-448.
- [22] 李玉婷, 赵奇, 房冰, 等. 禾谷缢管蚜热激蛋白 *Hsp90* 基因的克隆和表达分析[J]. 植物保护学报, 2017, 44(1): 16-23.

Difference analysis of thermotolerance between two *Lecanicillium lecanii* strains

GU Zumin GE Waner JI Mingshan

College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract By comparing the difference of thermotolerance and the relationship between thermotolerance and heat shock protein (Hsp) mRNA level of two *Lecanicillium lecanii* strains, the mechanism of Hsp on heat stress tolerance was studied. The thermotolerance of mycelia and conidia between *L. lecanii* strain VL17 and VL18 were compared using mycelium growth rate method and spore germination method. Spray inoculation method was adopted to estimate the virulence of strain VL17 and VL18 against *Lipaphis erysimi* under high temperature stress. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to compare expression of the *sHsp* and *Hsp70* genes. The results showed that the thermotolerance of both mycelia and conidia from strain VL18 were significantly higher than those from strain VL17. The colony diameter of strain VL18 was 63.16% bigger than that of VL17 at 34 °C and the conidia germination rate of VL18 was 103% higher than that of VL17 at 37 °C. The insecticidal activities of the two strains against *L. erysimi* were significantly different when the temperature was above 31 °C. The corrected mortality of *L. erysimi* inoculated with VL18 was 166.67% higher than that with VL17 at 37 °C. The qRT-PCR analysis showed that the *sHsp* and *Hsp70* mRNA of VL18 were higher than that of VL17 at 42 °C when the stress time was same. After a 120 min stress, expression of the *Hsp70* and *sHsp* genes of strain VL18 were 16.97 and 63.74 folds as those of strain VL17, respectively. Furthermore, the expression of *sHsp* in both strains were significantly higher than those of *Hsp70*. In conclusion, *sHsp* played an important role in the response of *L. lecanii* to heat stress.

Keywords *Lecanicillium lecanii*; high temperature stress; heat shock protein

(责任编辑:边书京)