

## 研究报告

转录组分析罗伯茨绿僵菌精胺合成酶 MrSPS 介导真菌  
血腔定殖功能李心怡<sup>#</sup>, 王凯<sup>#</sup>, 陈浩然, 万荣杰, 黄勃, 王玉龙<sup>\*</sup>

安徽农业大学安徽省微生物防治重点实验室, 安徽 合肥 230036

李心怡, 王凯, 陈浩然, 万荣杰, 黄勃, 王玉龙. 转录组分析罗伯茨绿僵菌精胺合成酶 MrSPS 介导真菌血腔定殖功能[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4118-4133

Li Xinyi, Wang Kai, Chen Haoran, Wan Rongjie, Huang Bo, Wang Yulong. Transcriptomic analysis of *Metarhizium robertsii* during hemocoel colonization after deletion of a spermine synthase MrSPS[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4118-4133

**摘要:** 【背景】精胺在植物应对逆境胁迫、动物抵抗疲劳和衰老、真菌生长代谢等过程中发挥重要作用, 但目前昆虫病原真菌中的研究未见报道。【目的】在分子水平上探究罗伯茨绿僵菌精胺合成关键酶——精胺合成酶在昆虫血腔定殖中的作用机制。【方法】显微注射法测定 *MrspS* 敲除株  $\Delta MrspS$  的致病力变化, 并观察血腔中  $\Delta MrspS$  生长状态; 收集  $\Delta MrspS$  和野生型 WT 注射感染 30 h 后的大蜡螟血淋巴进行转录组测序, 分别与罗伯茨绿僵菌和大蜡螟参考基因组进行比对分析, 并结合定量 PCR 进行验证。【结果】与 WT 和回补株  $\Delta MrspS$ -cp 相比较,  $\Delta MrspS$  致病力显著下降, 而且随着注射浓度的降低,  $\Delta MrspS$  致病力下降越显著。感染 36 h 后 WT 和  $\Delta MrspS$  孢子都能正常萌发且开始以类酵母状态生长, 60 h 后, 相较于 WT,  $\Delta MrspS$  的生长繁殖数量较少。转录组共检测到 3 202 个罗伯茨绿僵菌基因, 其中 1 769 个基因在  $\Delta MrspS$  中表达上调, 922 个基因表达下调; 差异表达基因涉及碳水化合物代谢、运输、分解代谢、翻译和氨基酸代谢等多条途径; 筛选出 28 个血腔致病相关基因全部在  $\Delta MrspS$  中表达下调; 定量 PCR 检测发现在整个血腔定殖阶段免疫逃避蛋白 McI1 基因和血腔定殖 Colonization of hemocoel 1 基因在 WT 和  $\Delta MrspS$ -cp 中的表达量高于  $\Delta MrspS$ 。共检测到 13 249 个大蜡螟基因, 其中 4 026 个差异表达基因; KEGG 注释分析显示大量差异表达基因富集到内分泌系统和免疫系统途径; 深入分析发现 22 个差异表达基因归

基金项目: 国家自然科学基金(32102274); 安徽省大学生创新训练计划(S202010364088); 安徽农业大学大学生创新训练计划(202110364240)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (32102274); Anhui College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202010364088); Anhui Agricultural University College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (202110364240)

<sup>#</sup>These authors equally contributed to this work

**\*Corresponding author:** E-mail: wyl2019@ahau.edu.cn

**Received:** 2022-02-07; **Accepted:** 2022-04-15; **Published online:** 2022-06-02

属于 Toll 和 Imd 信号通路, 其中 18 个基因在  $\Delta Mrsp$ s 侵染的大蜡螟中表达上调, 表明  $\Delta Mrsp$ s 侵染大蜡螟过程中更易引起免疫系统的激活。【结论】揭示了 *Mrsp*s 在罗伯茨绿僵菌血腔定殖阶段作用的分子机制, 为进一步揭示精胺在真菌中的作用机理提供了理论基础。

关键词: 转录组; 罗伯茨绿僵菌; 精胺合成酶; 血腔定殖

## Transcriptomic analysis of *Metarhizium robertsii* during hemocoel colonization after deletion of a spermine synthase MrSPS

LI Xinyi<sup>#</sup>, WANG Kai<sup>#</sup>, CHEN Haoran, WAN Rongjie, HUANG Bo, WANG Yulong<sup>\*</sup>

Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

**Abstract:** [Background] Spermine plays an important role in plant defense response, animal anti-fatigue and anti-aging fight, and fungal growth and metabolism. However, there have been few reports on spermine function in the entomopathogenic fungi. [Objective] The study explored the molecular mechanism of spermine synthase (MrSPS) from *Metarhizium robertsii* during insect hemocoel colonization. [Methods] Insect bioassays of *Galleria mellonella* larvae were performed to examine the virulence of *Mrsp*s deleted *M. robertsii* ( $\Delta Mrsp$ s), and the growth characteristics of  $\Delta Mrsp$ s in hemolymph were observed. Hemolymph of *G. mellonella* larvae injected with  $\Delta Mrsp$ s and wild-type (WT) strains for 30 h were collected for transcriptome sequencing, and comparisons were made with genes from *M. robertsii* and *G. mellonella* separately. Real-time quantitative PCR was performed for verification of transcriptome sequencing. [Results] Compared to WT and complementation ( $\Delta Mrsp$ s-cp) strains,  $\Delta Mrsp$ s showed significantly decreased virulence, and the pathogenicity of  $\Delta Mrsp$ s reduced markedly with decreasing of the injection concentration. After 36 h of infection, spores from both WT and  $\Delta Mrsp$ s germinated normally and began to grow in a yeast-like state, while  $\Delta Mrsp$ s biomass was less than that of WT after 60 h. A total of 3 202 genes were detected from *M. robertsii*, of which 1 769 were up-regulated and 922 were down-regulated in  $\Delta Mrsp$ s. Lots of differentially expressed genes (DEGs) were involved in carbohydrate metabolism, and transport, catabolism, translation, and amino acid metabolism pathways. All identified 28 genes related to hemocoel colonization from DEGs were down-regulated in  $\Delta Mrsp$ s. Real-time quantitative PCR showed that both Collagen-like protein and Colonization of hemocoel 1 genes were decreased during the whole stage of hemocoel colonization in  $\Delta Mrsp$ s compared to the conditions in WT and  $\Delta Mrsp$ s-cp. A total of 13 249 genes were detected from *G. mellonella*, of which 4 026 genes had differential expression. KEGG analysis revealed most of DEGs were enriched in endocrine system and immune system. Furthermore, among the 22 genes involved in Toll and Imd signaling pathways, 18 were up-regulated in *G. mellonella* infected by  $\Delta Mrsp$ s, which suggested  $\Delta Mrsp$ s was more likely to cause the activation of the insect immune system than WT. [Conclusion] The molecular mechanism of MrSPS function in hemocoel colonization of *M. robertsii*

was explored for the first time, which provided a theoretical basis for further revealing the mechanism of spermine function in fungi.

**Keywords:** transcriptome; *Metarhizium robertsii*; spermine synthase; hemocoel colonization

多胺广泛存在于各种活细胞中,并且不同物种细胞中多胺的种类和数量具有明显差异<sup>[1]</sup>。其中,具有脂肪族含氮碱基的精胺是真核生物中重要的一类低分子量多胺,在细胞分裂、胚胎发育、繁殖衰老、逆境胁迫反应等生理和发育过程中起着不可或缺的作用<sup>[2]</sup>。细胞内精胺主要携带正电荷并以游离和共轭形式存在,能够与聚阴离子分子(磷脂、蛋白质和核酸等)相互作用,直接参与DNA合成、基因转录和蛋白质翻译等<sup>[3-5]</sup>。自1977年以来,人们一直认为真菌中的精胺不存在或者存在很少,对于真菌生长代谢等过程无作用<sup>[6]</sup>。然而最近几年的研究表明,精胺对于真菌生长、发育、致病和代谢产物合成等过程起着重要作用<sup>[7-10]</sup>。目前,研究已表明精胺通过调控氧化稳态和植物激素信号传导等分子通路,参与植物的生物和非生物逆境胁迫<sup>[11]</sup>,但精胺是否参与真菌的抗逆反应及其功能机制的研究还比较少。

昆虫病原真菌具有无公害、无残留、害虫不易产生抗性等特点,在害虫的生物防治中占有越来越重要的地位,其中绿僵菌(*Metarhizium*)是一类重要的昆虫病原真菌,已经商品化并应用于害虫的生物防治<sup>[12-14]</sup>。虽然绿僵菌应用的范围广、时间长,但是同其他昆虫病原真菌一样,绿僵菌杀虫剂也存在防治效果不稳定、杀虫速度慢等缺点,其中绿僵菌定殖寄主血淋巴的能力是影响防治效果的一个重要因素<sup>[15-17]</sup>。绿僵菌成功定殖于寄主血淋巴这种逆境涉及众多方面,比如抑制或者逃避寄主的免疫保护反应、钝化寄主防御能力的基因,进而能够有效地获取寄主体内的营养物质进行生长繁殖等。因此,需

要进一步研究绿僵菌在寄主血淋巴定殖的机理,探寻新的血腔定殖相关重要抗逆调控因子。

转录组测序可以反映真菌细胞在一定条件下生理活动中基因的差异表达,能够直接揭示参与特定生理过程的相关基因及其转录状态变化。本研究进一步对寄主血淋巴定殖过程中的编码精胺合成酶基因 *Mrsp*s 敲除株( $\Delta$ *Mrsp*s)进行转录组测序,分别比较  $\Delta$ *Mrsp*s 与野生型感染后寄主血淋巴基因的差异表达情况,以期在分子水平上探究精胺合成酶在罗伯茨绿僵菌血腔定殖过程中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株和昆虫

罗伯茨绿僵菌 ARSEF 23 (ATCC MYA-3075) 为原始野生型菌株(WT)。*Mrsp*s 敲除株( $\Delta$ *Mrsp*s)和敲除回补株( $\Delta$ *Mrsp*s-cp)均是基于根癌农杆菌菌株 *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 介导的真菌遗传转化方法构建。所有菌株均保存于安徽农业大学微生物防治重点实验室。供试昆虫为大蜡螟五龄幼虫,上海瑞清钓饵公司。

### 1.2 主要试剂和仪器及培养基

cDNA 合成试剂盒和 SYBR Green Kit, TaKaRa 公司。HiSeq 2500 高通量测序仪, Illumina 公司; 荧光定量 PCR 检测系统, Bio-Rad 公司; 恒温振荡器, 上海右一仪器有限公司; 高速离心机, 赛默飞世尔科技有限公司; 恒温培养箱, 上海智城分析仪器有限公司。PDA 固体培养基, Difco 公司。

### 1.3 致病力测定

将不同菌株(WT、 $\Delta$ *Mrsp*s 和  $\Delta$ *Mrsp*s-cp)接

种到 PDA 固体培养基中, 28 °C 静置培养 14 d。不同菌株孢子用 0.05% 的吐温溶液收集, 并分别稀释至浓度为  $10^4$ 、 $10^5$  和  $10^6$  孢子/mL。分别取 5  $\mu$ L 孢子悬浮液注射到大蜡螟的第二腹足, 放入铺有干净滤纸培养皿中, 在湿度为 80%、28 °C 条件下静置培养。以吐温溶液处理的大蜡螟作为对照组, 每 12 h 记录大蜡螟存活数量, 直至幼虫全部死亡。根据 SPSS 软件中的 Probit Analysis 来计算半致死时间  $LT_{50}$ <sup>[18]</sup>。每 30 只为一组, 每株菌一次 3 组, 试验重复 3 次。

#### 1.4 RNA 提取

取不同菌株注射侵染 36 h 后的大蜡螟幼虫血淋巴, 液氮研磨-Trizol 法提取总 RNA, 并利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。使用 NanoDrop 及 Agilent 2100 检测 RNA 的纯度及浓度。每组处理分别用 3 只虫子提取, RNA 质检合格后等浓度等体积混合为一个样品用于后续测序。

#### 1.5 cDNA 文库构建和测序

委托华大基因利用 Illumina 高通量测序平台 HiSeq 2500 进行 RNA-Seq 转录组测序。质检合格后的 RNA 经过 OligodT 的磁珠富集获得有 polyA 尾巴的 mRNA; 利用 DNA 探针杂交 rRNA, RNase H 进行消化 DNA/RNA 杂交链, 最后 DNase I 消化掉 DNA 探针。mRNA 经打断处理后利用随机的 N6 引物进行反转录, 然后合成 cDNA 二链形成双链 DNA。双链 DNA 的末端补平并分别进行 5'端磷酸化和 3'末端加 A 处理。基于特异引物的 PCR 扩增添加接头, 产物纯化后通过胶回收获得测序文库。文库质检合格后进行 Illumina HiSeq 2500 高通量测序。

#### 1.6 转录组数据组装及分析

为了确保信息分析结果的可靠性及准确性, 将测序所得 raw reads 去除掉低质量、测序接头和含 N 高于 10% 的 reads, 进而得到有效读

段 clean reads, 并利用 Bowtie 过滤掉核糖体的序列<sup>[19]</sup>。利用 Short Oligonucleotide Alignment Program (SOAP2) 软件分别比对罗伯茨绿僵菌 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Metarhizium+robertsii>) 和大蜡螟 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Galleria+mellonella>) 参考基因组。利用 fragments per kilobase per million (FPKM) 方法计算基因的表达量<sup>[20]</sup>。基于错误发生率小于 0.05 和差异表达量倍数在 2 倍以上的基因 ( $\log_2$  FC; FC: folds change) 这一标准来筛选差异基因。根据 NR 注释信息, 利用 BLAST2 GO 软件通过基因本体论 (Gene Ontology, GO) 数据库 (<http://www.geneontology.org>) 对获得的差异基因进行 GO 功能分类统计; 使用京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway, KEGG) 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg>) 对获得的差异基因进行 KEGG 注释。测序得到的原始数据上传到 NCBI SRA 数据库 (SRR17775416、SRR17775416 和 SRR17775418)。

#### 1.7 荧光定量 PCR 分析

采用液氮研磨-Trizol 法提取总 RNA。利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 利用 cDNA 合成试剂盒反转录 RNA 获得 cDNA。然后用 SYBR Green Kit 对目的基因表达量进行荧光定量 PCR 分析。分别以编码罗伯茨绿僵菌 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (MAA\_05302) 和大蜡螟 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (LOC113516033) 的基因作为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行相对定量分析<sup>[21]</sup>。本研究所用引物信息见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Mrsps* 敲除显著降低罗伯茨绿僵菌致病力

分别将野生型 (WT)、*Mrsps* 敲除株 ( $\Delta Mrsps$ )

表 1 本文所用引物信息

Table 1 Primer information involved in this study

基因号 Gene ID	基因名称 Gene name	引物序列 Sequence (5'→3') (F/R)
MAA_01665	Mcl1 gene (collagen-like protein gene)	CTCCAAGCCAACCTCGC/GAGGAAGAGCATAGCCAC
MAA_08820	Colonization of hemocoel 1 gene	GACTGGCCGATCAAGAGAAG/GCTCAAAAGTAGAGGCGGTG
MAA_07675	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene	GACTGCCCGCATTGAGAAG/AGATGGAGGAGTTGGTGTG
LOC113510109	Modular serine protease-like gene	CCAGGGAGCAGCAGATGTTA/CCTTGCGGTTCGTAGTCGTT
LOC113513204	Protein spaetzle gene	GTGCGGTCCGGTCAGTTGTCA/ATAAGTAAACGCCGGTGTGC
LOC113509647	Toll-like receptor 6 gene	CCGAGACCATGATGTGCTAC/TCCCTGTTTCTTCGGTAGTG
LOC113521683	WD repeat-containing protein gene	TGTTCCGATGCCAGCCTTAG/GCCCGACTTGTTAGTTATTGTTGT
LOC113517774	Pirk gene	GACGCTGATTCATTCCAATT/CCGACTACTTTCAACCGAGA
LOC113518290	Imd gene	ACTGCGATTAGGTCAACAAC/TTCCCAACACTCTAACTCTG
LOC113511724	Fadd gene	TAAGTGTGGGTTATGTGAC/TTTCGCCTTTGTCGTTTATT
LOC113517235	Dredd gene	AGTCGGACGCACTAACTCACTC/GCTACCGCCAATATCCTTGTAT
LOC113516167	Tab2 gene	AATGTTCCGGTGATAAAGTGATG/GCTAATGCGTGTTACCTTCTTG
LOC113510839	Dual specificity mitogen-activated protein kinase gene	GATTATGACATCAGGGCAGAC/CAAGTAACTTCGCGTATTTAGG
LOC113512859	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase gene	AAATCCGTCCAAACTAC/TAGCCAAGGTCTATGAGT
LOC113515821	Ankyrin gene	TTTCCAGGGTGGGCTTTA/CCAGAATCGTCGGGTGA
LOC113521894	Caspar gene	ATGACAGTCGCTGCTTT/ATGCCAGTATGATCTACAA
LOC113523440	Gallerimycin gene	CGTTTTCATAGTCGCAATA/GGTGGCTTGACGGTGAT
LOC113516033	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene	AAACAAGCCGCTGAAGTCC/GTCAATAACTCTGCTAGAATAGC CATAT

和敲除回补株( $\Delta Mrsp$ s-cp)吸取 5  $\mu$ L 孢悬液直接注射到大蜡螟幼虫中,以测定不同菌株的致病力。与 WT 和  $\Delta Mrsp$ s-cp 相比较, $\Delta Mrsp$ s 致病力显著下降,而且随着注射浓度的降低, $\Delta Mrsp$ s 致病力下降越显著( $P < 0.05$ ,图 1A)。当注射浓度为  $10^6$  个孢子/mL 时,半致死时间  $LT_{50}$  由 3.36 d (WT) 上升至 3.67 d ( $\Delta Mrsp$ s),增加约 10%;注射浓度为  $10^5$  个孢子/mL 时, $LT_{50}$  由 4.22 d (WT) 上升至 4.77 d ( $\Delta Mrsp$ s),增加约 10%;注射浓度为  $10^4$  个孢子/mL 时, $LT_{50}$  由 6.00 d (WT) 上升至 7.32 d ( $\Delta Mrsp$ s),增加约 22%。

分别吸取注射侵染后的大蜡螟幼虫血淋巴置于显微镜下观察,如图 1B 所示,36 h 后 WT

和  $\Delta Mrsp$ s 孢子均能正常萌发且开始以类酵母状态生长,同时幼虫产生大量血细胞参与免疫反应;注射 60 h 后,WT 在血淋巴中大量繁殖,但是相较于 WT, $\Delta Mrsp$ s 生长繁殖数量较少,表明此时 MrSPS 已经影响了罗伯茨绿僵菌在幼虫血腔中的定殖。

## 2.2 罗伯茨绿僵菌基因表达分析

提取注射 5  $\mu$ L 孢悬液( $10^4$  个孢子/mL) 36 h 后血淋巴总 RNA 用以转录组测序,通过基因组比对共检测到 3 202 个罗伯茨绿僵菌基因(图 2A)。其中分别有 886 和 1 517 个基因仅在 WT 和  $\Delta Mrsp$ s 中检测到,有 799 个基因在 WT 和  $\Delta Mrsp$ s 中共检测到。通过 FPKM 法对基因表达进行归一

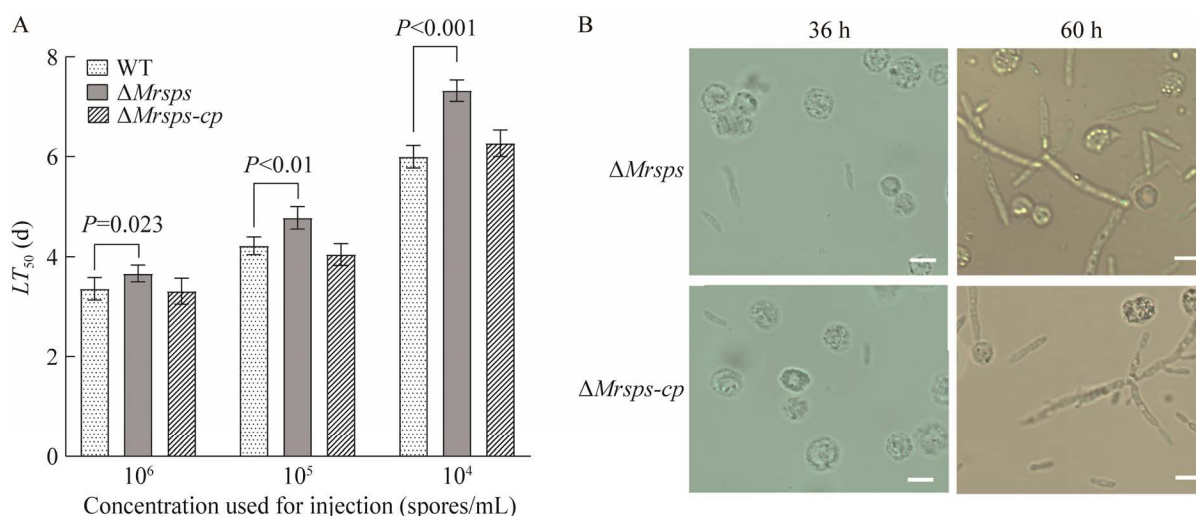


图 1 不同菌株致病力及昆虫血腔生长特征 A: 注射 5  $\mu$ L 不同浓度孢悬液的大蜡螟幼虫半致死时间; B: 不同菌株在幼虫血淋巴中生长特征, 标尺: 10  $\mu$ m

Figure 1 The pathogenicity of different strains and growth characteristics in insect hemolymph. A: Insect  $LT_{50}$  by direct injection of 5  $\mu$ L spore suspension with different concentration; B: Growth characteristics of different strains in larvae hemolymph; Scale bar: 10  $\mu$ m.

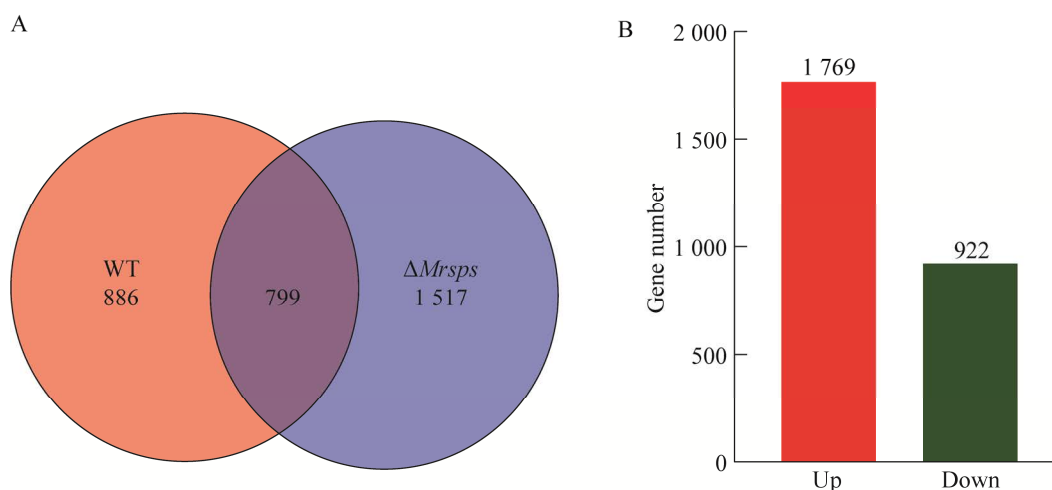


图 2 血淋巴中不同菌株的表达基因 A: 野生型和 *MrspS* 敲除株基因表达韦恩图; B: 相较于野生型,  $\Delta$ *MrspS* 菌株差异表达基因

Figure 2 Gene expression of different strains collected from insect hemolymph. A: Venn analysis of gene expression from WT and  $\Delta$ *MrspS*; B: Differentially expressed genes from  $\Delta$ *MrspS* compared to the wild-type.

化处理后, 基于错误发生率小于 0.05 和差异表达量倍数在 2 倍的原则共筛选出 2 691 个差异基因, 其中 1 769 个基因在  $\Delta$ *MrspS* 中高表达, 922 个基因下调表达(图 2B)。

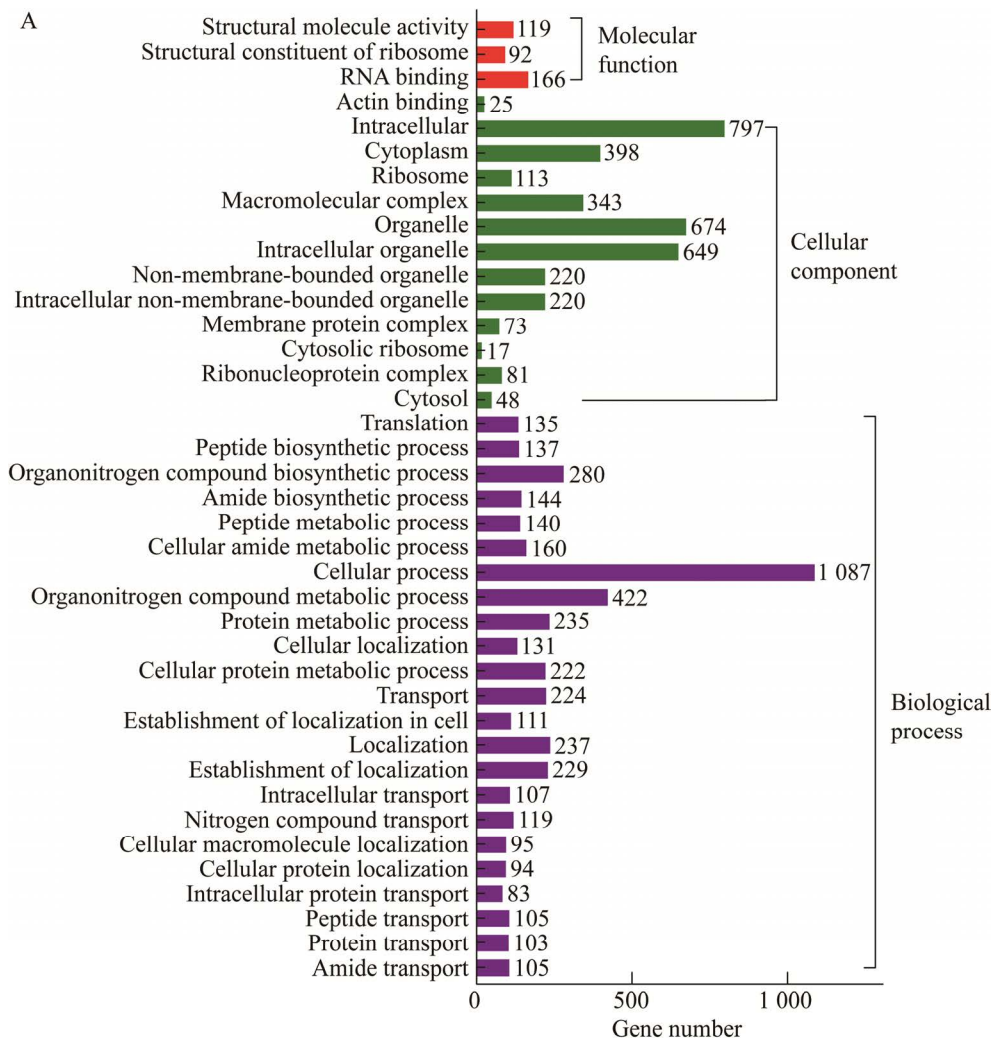
### 2.3 罗伯茨绿僵菌差异表达基因功能分析

基于 GO 数据库分析了罗伯茨绿僵菌差异表达基因在细胞组分(cellular component)、分子功能(molecular function)及生物学过程(biological

process)等类别中的功能信息。差异表达基因能够富集到 40 种 GO 二级类别上: 在分子功能类别中, 差异表达基因主要归属于结构分子活性(structural molecule activity)、核糖体的结构成分(structural constituent of ribosome)、RNA 结合(RNA binding)等功能分类; 在细胞组分类别中, 差异表达基因主要归属于细胞内(intracellular)、细胞器(organelle)、胞内细胞器(intracellular organelle)等功能分类; 在生物学过程组分类别中, 差异表达基因主要归属于细胞过程(cellular progress)、有机氮化合物代谢过程(organonitrogen compound metabolic process)、有机氮化合物生物合成(organonitrogen compound biosynthetic

process)等功能分类(图 3A)。

为了解差异表达基因可能参与的生物学过程, 基于 KEGG 数据库进行了代谢途径分析。差异表达基因能够富集到 22 条 KEGG 代谢途径(图 3B)。其中, 差异表达基因富集最多的途径为全局和总览图(global and overview)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、运输和分解代谢(transport and catabolism)、翻译(translation)和氨基酸代谢(amino acid metabolism)等, 分别为 761、339、271、268 和 260 个差异表达基因。碳水化合物代谢、运输和分解代谢及氨基酸代谢等途径直接参与罗伯茨绿僵菌寄主体内的营养物质吸收和转化。



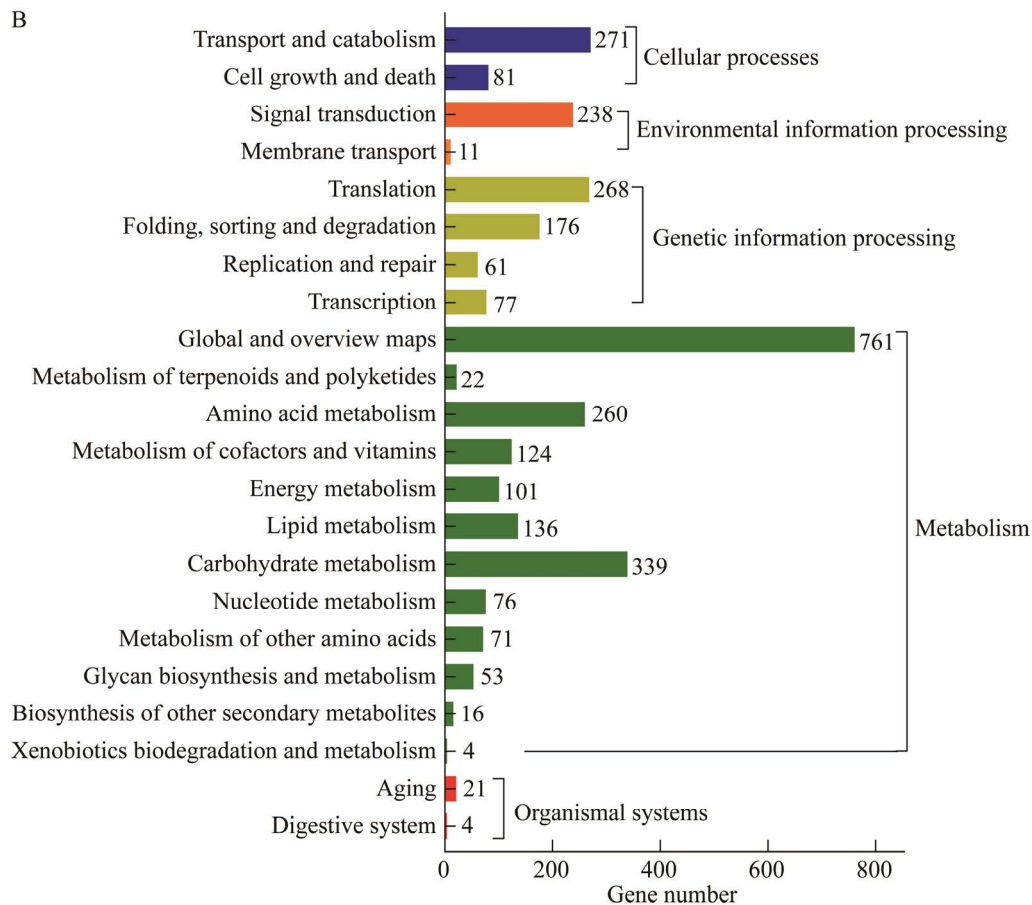


图3 罗伯茨绿僵菌差异表达基因 GO 和 KEGG 功能分析 A: 罗伯茨绿僵菌差异表达基因的 GO 功能分析; B: 罗伯茨绿僵菌差异表达基因的 KEGG 功能分析

Figure 3 GO and KEGG functional analysis of differential expressed genes from *M. robertsii*. A: GO functional analysis of differential expressed genes from *M. robertsii*; B: KEGG functional analysis of differential expressed genes from *M. robertsii*.

#### 2.4 罗伯茨绿僵菌血腔定殖相关基因表达分析

为探索 MrSPS 在绿僵菌血腔定殖过程中的致病功能, 进一步对  $\Delta MrspS$  血腔侵染过程中致病基因的表达进行了分析<sup>[22-24]</sup>。从差异表达基因中共筛选出 28 个血腔致病相关基因, 在  $\Delta MrspS$  中全部下调表达, 其中包括 13 个蛋白酶(肽酶)和 10 个蛋白激酶(图 4A)。Colonization of hemocoel 1 蛋白能够直接抑制体壁穿透相关基因的转录, 同时促进血腔定殖相关基因的表

达, 进而促进罗伯茨绿僵菌血腔致病,  $\Delta MrspS$  中 Colonization of hemocoel 1 基因表达量显著低于 WT, 表明 MrSPS 敲除影响了 Colonization of hemocoel 1 基因的正常表达(图 4B)。免疫逃避蛋白 Collagen-like protein (Mcl1) 通过直接包裹作用使绿僵菌能够避免昆虫血腔免疫系统的识别和攻击,  $\Delta MrspS$  中 Mcl1 基因表达量显著低于 WT, 表明 MrSPS 可影响 Mcl1 基因表达量参与绿僵菌的血腔定殖过程(图 4C)。为排除  $\Delta MrspS$  与 WT 在血淋巴中的生长速率差异导致不同基



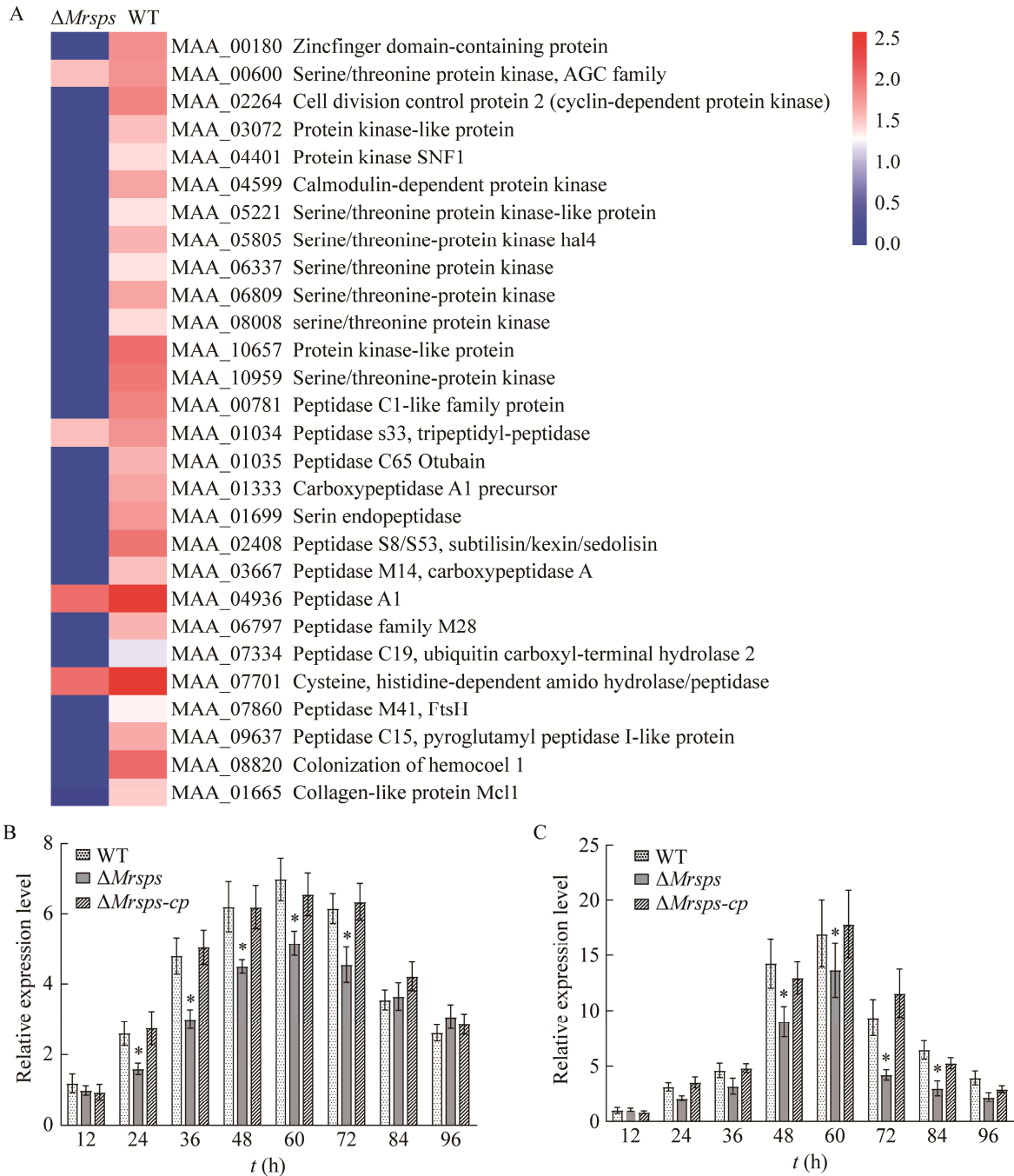


图 4 罗伯茨绿僵菌血腔定殖相关差异表达基因 A: 罗伯茨绿僵菌血腔定殖相关差异表达基因聚类热图; B: 侵染不同阶段罗伯茨绿僵菌 Mcl1 基因表达特征; C: 侵染不同阶段罗伯茨绿僵菌 Colonization of hemocoel 1 基因表达特征。\*: 处理间数据差异显著,  $P < 0.05$

Figure 4 Expression characteristics of differential expressed genes involved in hemocoel colonization from *M. robertsii*. A: Heat map of differentially expressed genes involved in hemocoel colonization; B: Expression characteristics of Mcl1 gene from different stages of insect infected with *M. robertsii*; C: Expression characteristics of Colonization of hemocoel 1 gene from different stages of insect infected with *M. robertsii*. \*: Data were significant difference between treatments,  $P < 0.05$ .

因表达的差异, 我们基于定量 PCR 对罗伯茨绿僵菌不同侵染阶段的 Colonization of hemocoel 1 和 Mcl1 基因表达量进行检测, 结果表明 2 个基因在  $\Delta Mrsp$ s 与 WT 中的表达量变化趋势类似, 排除了生长速率差异导致基因表达量差异的可能性(图 4B 和 4C)。

## 2.5 大蜡螟基因表达分析

为进一步明确 *Mrsp*s 敲除导致绿僵菌血腔致病力下降的机理, 对 WT 和  $\Delta Mrsp$ s 侵染 36 h 的血淋巴中大蜡螟(分别命名为 WT-I 和  $\Delta Mrsp$ s-I)的基因表达量进行了分析。通过比到大蜡螟基因组, 共检测到 13 249 个大蜡螟基因, 其中分别有 194 和 818 个基因仅在 WT-I 和  $\Delta Mrsp$ s-I 中检测到(图 5A)。此外共筛选出 4 026 个差异表达基因, 其中 3 835 个基因在  $\Delta Mrsp$ s-I 中高表达, 191 个基因下调表达(图 5B)。

## 2.6 大蜡螟差异表达基因功能分析

基于 GO 数据库分析大蜡螟差异表达基因显示, 富集差异基因最多的为细胞解剖实体

(cellular anatomical entity)、结合(binding)、催化活性(catalytic activity)和细胞过程(cellular process), 分别为 891、764、685 和 555 个差异表达基因(图 6A)。基于 KEGG 数据库分析显示, 差异表达基因能够富集到 21 条 KEGG 代谢途径, 其中信号转导(signal transduction)、运输和分解代谢(transport and catabolism)、内分泌系统(endocrine system)和免疫系统(immune system)为差异表达基因富集最多的途径, 分别有 372、265、225 和 198 个差异表达基因(图 6B)。内分泌系统和免疫系统直接参与昆虫的血腔免疫反应, 表明 *Mrsp*s 的敲除影响了罗伯茨绿僵菌诱导的大蜡螟血腔免疫系统。

## 2.7 大蜡螟免疫相关基因表达分析

昆虫免疫系统较复杂多样, 为进一步解析 WT 和  $\Delta Mrsp$ s 侵染引起的大蜡螟免疫反应差异, 深入分析了大蜡螟免疫相关基因的表达。共鉴定出 75 个差异表达免疫应答相关基因, 归属于 12 个不同的免疫相关信号通路(图 7A)。Toll

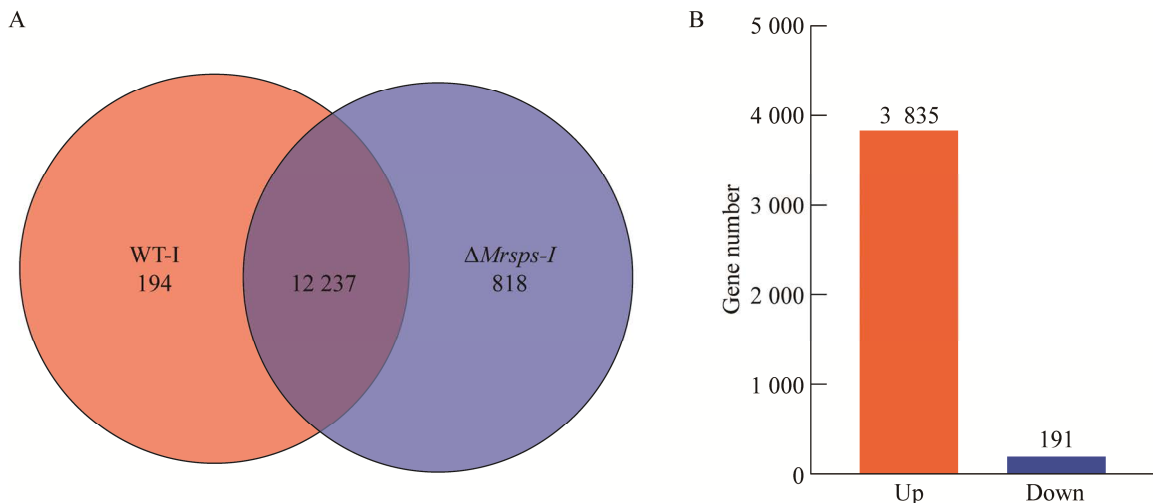


图 5 不同菌株侵染后大蜡螟的表达基因 A: 野生型(WT-I)和 *Mrsp*s 敲除株( $\Delta Mrsp$ s-I)侵染后大蜡螟的基因表达韦恩图; B:  $\Delta Mrsp$ s 侵染后大蜡螟的差异表达基因

Figure 5 Gene expression from *G. mellonella* infected with different strains. A: Venn analysis of gene expression from *G. mellonella* infected with WT and  $\Delta Mrsp$ s; B: Differential expressed genes from *G. mellonella* infected with  $\Delta Mrsp$ s compared to the WT.

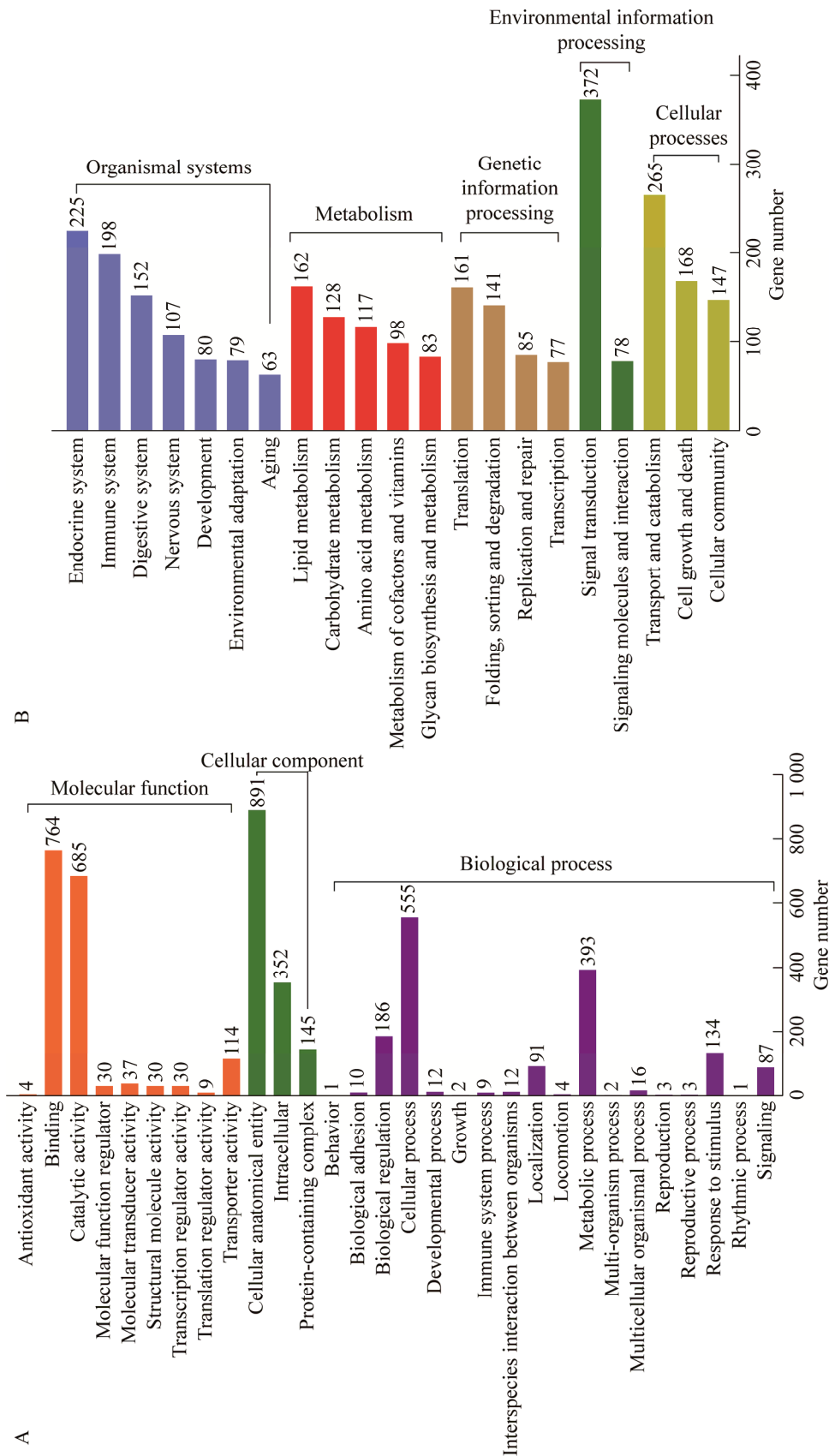
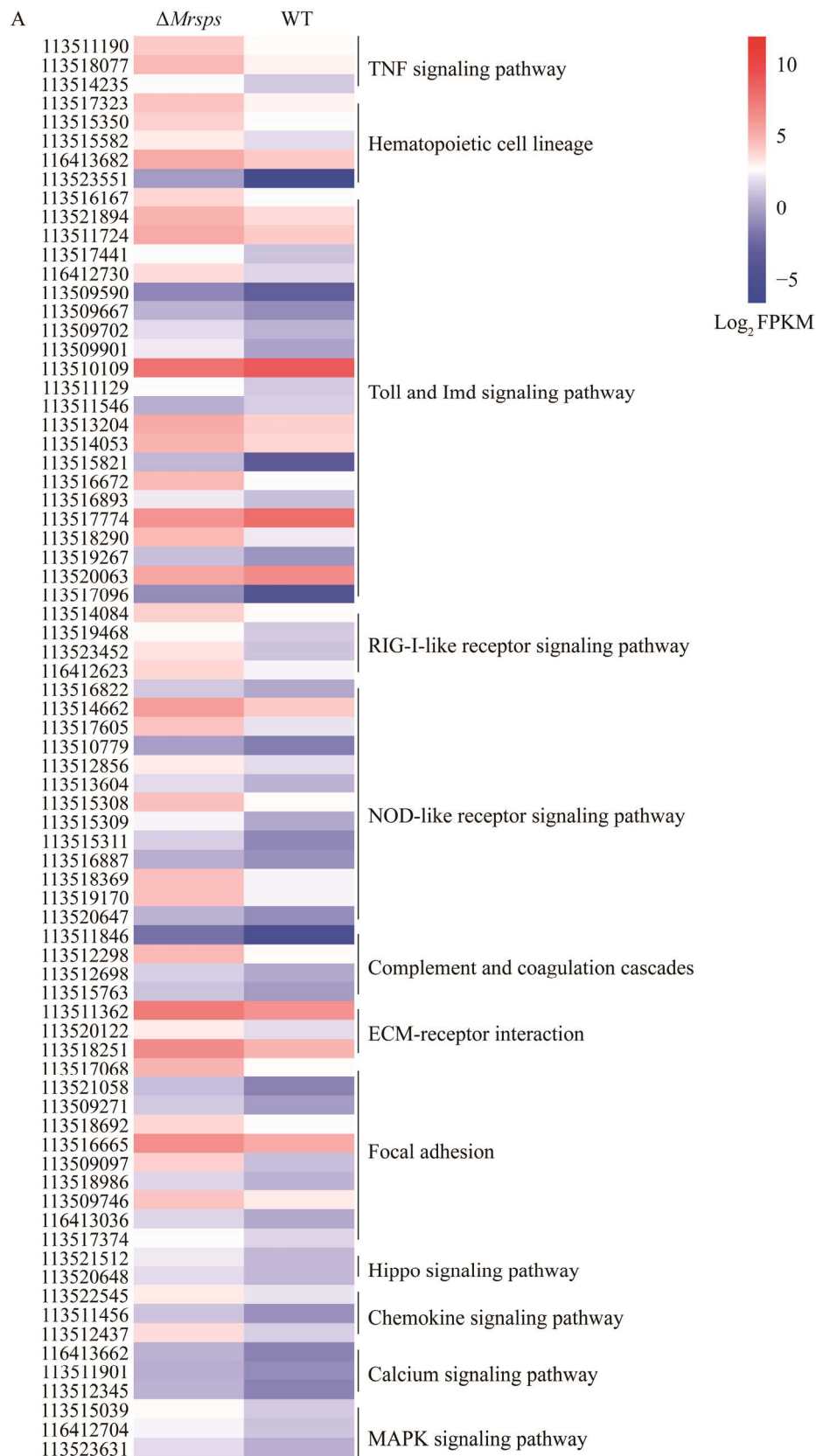


图 6 大蜡螟差异表达基因GO和KEGG功能分析 A: 大蜡螟差异表达基因的GO功能分析; B: 大蜡螟差异表达基因的KEGG功能分析

Figure 6 GO and KEGG functional analysis of differential expressed genes from *G. mellonella*. A: GO functional analysis of differential expressed genes from *G. mellonella*; B: KEGG functional analysis of differential expressed genes from *G. mellonella*.



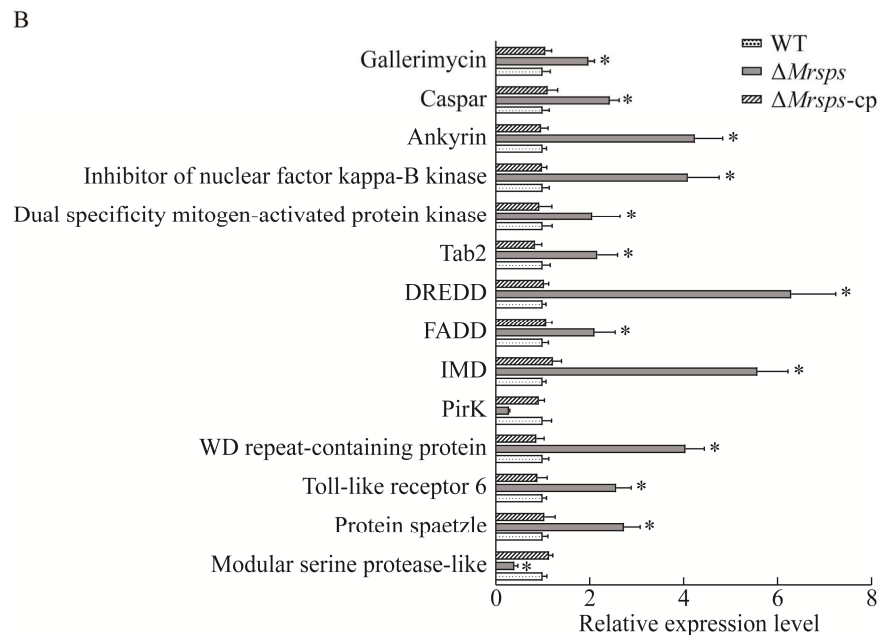


图7 大蜡螟免疫相关差异表达基因 A: 大蜡螟免疫相关差异表达基因聚类热图; B: Toll 和 Imd 信号通路相关基因的定量 PCR 验证。\*: 处理间数据差异显著,  $P < 0.05$

Figure 7 Expression characteristics of differentially expressed genes involved in immunity from *G. mellonella*. A: Heat map of differentially expressed genes involved in immunity; B: Real-time quantitative PCR verification of genes involved in Toll and Imd signaling pathway. \*: Data were significant difference between treatments,  $P < 0.05$ .

和 immune deficiency (Imd) 是昆虫中 2 个主要的免疫信号转导途径, 它们都能产生免疫活性物质——抗菌肽。分析发现共有 22 个差异表达基因归属于 Toll 和 Imd 信号通路, 其中 18 个基因在  $\Delta Mrsps-I$  上调表达, 表明  $\Delta Mrsps$  侵染大蜡螟过程中更易引起免疫系统的激活。

为验证转录组测序的准确性, 选择了 Toll 和 Imd 信号通路中 14 个差异表达基因进行定量 PCR 检测。结果如图 7B 所示, 其中 13 个基因表达的变化趋势与转录组测序结果一致, 表明转录组测序的高准确性(图 4B 和 4C)。

### 3 讨论与结论

真核生物中, 腐胺能在亚精胺合成酶作用下合成亚精胺, 然后经过精胺合成酶作用转化

成精胺, 因此, 精胺合成酶作为精胺合成的最后关键酶, 对于精胺的合成起着至关重要的作用<sup>[25]</sup>。目前关于精胺作用的研究主要集中于动植物, 对于其在真菌中作用的报道还较少<sup>[11,26-27]</sup>。在植物中, 精胺在植物应对逆境胁迫(抗干旱、低氧、高温、低温、盐和重金属)中起着重要作用; 精胺可提高动物抗疲劳、抗衰老和抗肿瘤的能力<sup>[28-29]</sup>。当前研究表明, 精胺影响真菌生长代谢、菌丝形态转变和菌落结构、附着胞形成和体壁穿透等, 但是否参与真菌的抗逆反应尚未见报道<sup>[8-9,30]</sup>。在本研究中, 与 WT 和  $\Delta Mrsps-cp$  相比, 随着注射浓度的降低,  $\Delta Mrsps$  致病力下降越显著, 表明 MrSPS 在罗伯茨绿僵菌较少时作用更为显著。注射孢子进入昆虫血腔 30 h, WT 和  $\Delta Mrsps$  都能够正常萌发生长; 但是 60 h

后, 相较于 WT,  $\Delta Mrsp$ s 生长繁殖数量较少, 表明 MrSPS 在 60 h 之前已经开始发挥作用。

转录组测序显示, 在 WT 和  $\Delta Mrsp$ s 侵染 30 h 已经有 2 691 个基因发生了差异表达, 证实 MrSPS 在血腔定殖早期已经发挥作用。昆虫体内高渗透压和营养物质的特殊性对绿僵菌构成了极大的压力环境, 因此绿僵菌在血腔定殖阶段需要快速适应逆境并大量繁殖<sup>[31]</sup>。KEGG 数据库分析显示, 大量差异基因富集在碳水化合物代谢、运输、分解代谢及氨基酸代谢等营养吸收利用相关途径, 表明 MrSPS 有助于绿僵菌在血腔逆境下营养的获取和吸收。Mcl1 可以使绿僵菌逃避昆虫免疫反应中的识别和包裹,  $\Delta Mrsp$ s 中 Mcl1 基因表达量显著低于 WT, 说明 MrSPS 的敲除使得绿僵菌逃避昆虫的免疫能力下降, 从而更早地诱发昆虫的免疫反应, 这与本研究中大蜡螟 Toll 和 Imd 免疫通路中的基因表达模式一致<sup>[22]</sup>。此外, Colonization of hemocoel 1 能够上调罗伯茨绿僵菌血腔定殖相关基因的表达,  $\Delta Mrsp$ s 中 Colonization of hemocoel 1 基因表达量显著低于 WT, 进一步表明 MrSPS 对罗伯茨绿僵菌血腔定殖具有重要的作用<sup>[23]</sup>。

为进一步明确 MrSPS 对罗伯茨绿僵菌血腔致病起着关键作用, 我们对 WT 和  $\Delta Mrsp$ s 侵染的大蜡螟基因表达量进行了分析。通过分析大蜡螟差异表达基因, 发现 75 个差异表达免疫应答相关基因, 归属于 12 个不同的免疫相关信号通路, 其中 94.67% (71/75) 的基因在  $\Delta Mrsp$ s 侵染的大蜡螟中显著上调, 表明 MrSPS 的缺失使得大蜡螟免疫反应更强烈。Toll 和 Imd 是昆虫中 2 个主要的免疫信号转导途径, 能够产生多种抗菌肽抑制真菌的侵染, 本研究中发现富集此通路的 22 个差异表达基因有 18 个基因(包括抗菌肽 *gallerimycin* 编码基因)在  $\Delta Mrsp$ s 侵染的大蜡螟中显著上调, 大蜡螟免疫系统对  $\Delta Mrsp$ s

比 WT 具有更强的免疫防御能力<sup>[32-33]</sup>。

病原真菌的致病和昆虫的免疫这 2 个复杂过程决定了真菌毒杀昆虫的速率<sup>[17,32]</sup>。本研究发现, MrSPS 的缺失使绿僵菌逃避昆虫免疫反应中的识别和包裹基因 Mcl1 基因表达量下调, 可能导致绿僵菌进入虫体血腔后更容易被昆虫免疫系统识别。同样地,  $\Delta Mrsp$ s 侵染的大蜡螟 Toll 和 Imd 免疫信号转导途径中大量基因上调, 表明大蜡螟能够更有效地识别  $\Delta Mrsp$ s, 进而启动更强的免疫防御。

综上所述, 本研究基于转录组测序技术分析了 *Mrsp*s 敲除对罗伯茨绿僵菌血腔定殖过程基因表达的影响, 同时对寄主大蜡螟的基因表达进行了分析, 研究结果为将来深入探索绿僵菌在寄主血淋巴定殖机理, 以及寻找新的血腔定殖相关的重要抗逆调控因子提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Igarashi K, Kashiwagi K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2019, 107: 104-115
- [2] Sequera-Mutiozabal M, Antoniou C, Tiburcio AF, Alcázar R, Fotopoulos V. Polyamines: emerging hubs promoting drought and salt stress tolerance in plants[J]. Current Molecular Biology Reports, 2017, 3(1): 28-36
- [3] Tiburcio AF, Altabella T, Bitrián M, Alcázar R. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress[J]. Planta, 2014, 240(1): 1-18
- [4] Tavladoraki P, Cona A, Federico R, Tempera G, Viceconte N, Saccoccio S, Battaglia V, Toninello A, Agostinelli E. Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants[J]. Amino Acids, 2012, 42(2/3): 411-426
- [5] Hassan N, Ebeed H, Aljaarany A. Exogenous application of spermine and putrescine mitigate adversities of drought stress in wheat by protecting membranes and chloroplast ultra-structure[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants: an International Journal of Functional Plant Biology, 2020,

- 26(2): 233-245
- [6] Nickerson KW, Dunkle LD, Van Etten JL. Absence of spermine in filamentous fungi[J]. *Journal of Bacteriology*, 1977, 129(1): 173-176
- [7] Valdés-Santiago L, Ruiz-Herrera J. Stress and polyamine metabolism in fungi[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2014, 1: 42
- [8] Rocha RO, Elowsky C, Pham NTT, Wilson RA. Spermine-mediated tight sealing of the *Magnaporthe oryzae* appressorial pore–rice leaf surface interface[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(12): 1472-1480
- [9] Majumdar R, Lebar M, Mack B, Minocha R, Minocha S, Carter-Wientjes C, Sickler C, Rajasekaran K, Cary JW. The *Aspergillus flavus* spermidine synthase (*spds*) gene, is required for normal development, aflatoxin production, and pathogenesis during infection of maize kernels[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 317
- [10] Dorighetto Cogo AJ, Dutra Ferreira KDR, Okorokov LA, Ramos AC, Façanha AR, Okorokova-Façanha AL. Spermine modulates fungal morphogenesis and activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase during yeast to hyphae transition[J]. *Biology Open*, 2018, 7(2): bio029660
- [11] Seifi HS, Shelp BJ. Spermine differentially refines plant defense responses against biotic and abiotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 117
- [12] Stone LBL, Bidochka MJ. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(23): 9935-9945
- [13] Hernández-Rosas F, García-Pacheco LA, Figueroa-Rodríguez KA, Figueroa-Sandoval B, Salinas Ruiz J, Sangerman-Jarquín DM, Díaz-Sánchez EL. Analysis of research on *Metarhizium anisopliae* in the last 40 years[J]. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 2019(22): 155-166
- [14] Brunner-Mendoza C, Reyes-Montes MDR, Moonjely S, Bidochka MJ, Toriello C. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2019, 29(1): 83-102
- [15] Vidhate RP, Dawkar VV, Puneekar SA, Giri AP. Genomic determinants of entomopathogenic fungi and their involvement in pathogenesis[J]. *Microbial Ecology*, 2022. DOI: 10.1007/s00248-021-01936-z
- [16] Corval ARC, Mesquita E, Corrêa TA, De S R Silva C, De O B Bitencourt R, Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP, Roberts DW, Gôlo PS. UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(1): 15-26
- [17] Wang CS, Wang SB. Insect pathogenic fungi: genomics, molecular interactions, and genetic improvements[J]. *Annual Review of Entomology*, 2017, 62: 73-90
- [18] 汪章勋, 徐秀珍, 冯健雨, 周权, 黄勃. *MrXrn1* 基因参与调控罗伯茨绿僵菌的产孢和致病[J]. *中国生物防治学报*, 2020, 36(5): 721-728
- Wang ZX, Xu XZ, Feng JY, Zhou Q, Huang B. *MrXrn1* involved in the regulation of conidiation and pathogenicity in *Metarhizium robertsii*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2020, 36(5): 721-728 (in Chinese)
- [19] Langmead B. Aligning short sequencing reads with bowtie[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2010, 32(1): 11.7.1-11.7.14
- [20] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628
- [21] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [22] Wang CS, St Leger RJ. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses[J]. *PNAS*, 2006, 103(17): 6647-6652
- [23] Zhang X, Meng YM, Huang YZ, Zhang D, Fang WG. A novel cascade allows *Metarhizium robertsii* to distinguish cuticle and hemocoel microenvironments during infection of insects[J]. *PLoS Biology*, 2021, 19(8): e3001360
- [24] Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang YJ, Xiao GH, Shang YF, Duan ZB, Hu X, Xie XQ, Zhou G, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(1): e1001264
- [25] Pegg AE. The function of spermine[J]. *IUBMB Life*, 2014, 66(1): 8-18
- [26] Peng Q, Wong CYP, Cheuk IWY, Teoh JYC, Chiu PKF, Ng CF. The emerging clinical role of spermine in prostate cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4382
- [27] Morales TS, Avis EC, Paskowski EK, Shabar H, Nowotarski SL, DiAngelo JR. The role of spermidine synthase (SpdS) and spermine synthase (Sms) in

- regulating triglyceride storage in *Drosophila*[J]. Medical Sciences: Basel, Switzerland, 2021, 9(2): 27
- [28] 李霞, 程运河, 马晓东, 韩蕾, 孙振元. 多胺在植物抗逆中的生理机制[J]. 世界林业研究, 2018, 31(4): 23-28  
Li X, Cheng YH, Ma XD, Han L, Sun ZY. Physiological mechanism of polyamines in plant resistance[J]. World Forestry Research, 2018, 31(4): 23-28 (in Chinese)
- [29] 张凤, 何恩鹏, 王国元, 闫华伟. 外源亚精胺对生物抗逆性影响的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2015, 32(7): 1-4, 21  
Zhang F, He EP, Wang GY, Yan HW. Research progress on effect of extrinsic spermidine on resistance of organism[J]. Chemistry & Bioengineering, 2015, 32(7): 1-4, 21 (in Chinese)
- [30] Kummasook A, Cooper CR Jr, Sakamoto A, Terui Y, Kashiwagi K, Vanittanakom N. Spermidine is required for morphogenesis in the human pathogenic fungus, *Penicillium marneffeii*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2013, 58/59: 25-32
- [31] Wang CS, Duan ZB, St Leger RJ. MOS<sub>1</sub> osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph[J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7(2): 302-309
- [32] 刘小民, 袁明龙. 昆虫天然免疫相关基因研究进展[J]. 遗传, 2018, 40(6): 451-466  
Liu XM, Yuan ML. Progress in innate immunity-related genes in insects[J]. Hereditas, 2018, 40(6): 451-466 (in Chinese)
- [33] Schuhmann B, Seitz V, Vilcinskas A, Podsiadlowski L. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2003, 53(3): 125-133