

精胺合成酶 MrSPS 参与调控罗伯茨绿僵菌的生长发育、抗逆和致病力

伍君瑶[#], 李心怡[#], 宛文倩, 肖硕, 陆陈丽, 秦丽, 黄勃, 王玉龙^{*}

安徽农业大学微生物防治省重点实验室, 安徽 合肥 230036

摘要: 本研究以罗伯茨绿僵菌 *Metarhizium robertsii* 为研究对象, 针对鉴定出的精胺合成酶基因 (MAA_02088, *MrspS*), 利用农杆菌介导的同源重组方法获得 *MrspS* 敲除株 $\Delta MrspS$ 。与野生型相比, $\Delta MrspS$ 营养生长和产孢能力下降, 对氯化钠和紫外照射耐受性增强。大蜡螟幼虫毒力分析表明, 浸渍和注射两种情况下 $\Delta MrspS$ 致病力降低, 半致死时间(LT₅₀: 6.71 和 4.75 d)比野生型(LT₅₀: 5.17 和 4.19 d)显著增加。*MrspS* 敲除后不影响附着胞形成率和蝉翅穿透能力, 但会显著下调昆虫血腔定殖相关基因的表达量。这些结果说明精胺合成酶 MrSPS 参与调控罗伯茨绿僵菌的生长发育、外界胁迫应答和致病力。

关键词: 绿僵菌; 精胺合成酶; 生长发育; 胁迫应答; 致病力

[引用本文] 伍君瑶, 李心怡, 宛文倩, 肖硕, 陆陈丽, 秦丽, 黄勃, 王玉龙, 2022. 精胺合成酶 MrSPS 参与调控罗伯茨绿僵菌的生长发育、抗逆和致病力. 菌物学报, 41(10): 1647-1657

Wu JY, Li XY, Wan WQ, Xiao S, Lu CL, Qin L, Huang B, Wang YL, 2022. Spermine synthase is involved in the regulation of development, stress response and pathogenicity of *Metarhizium robertsii*. Mycosystema, 41(10): 1647-1657

Spermine synthase is involved in the regulation of development, stress response and pathogenicity of *Metarhizium robertsii*

WU Junyao[#], LI Xinyi[#], WAN Wenqian, XIAO Shuo, LU Chenli, QIN Li, HUANG Bo, WANG Yulong^{*}

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

Abstract: This study aimed at characterizing the function of spermine synthase gene (MAA_02088,

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2020M671838); 安徽省大学生创新训练计划(S202010364088, S202110364189)

Supported by the China Postdoctoral Science Foundation (2020M671838) and Anhui College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202010364088, S202110364189).

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

[#] Co-first author.

ORCID: WANG Yulong (0000-0003-1619-2265)

Received: 2022-01-26, accepted: 2022-03-01

*Mrsp*s) by knocking it out with *Agrobacterium*-mediated homologous recombination in *Metarhizium robertsii*. Compared to the wild-type, knocking strain Δ *Mrsp*s showed defects in radial growth and conidial production, and increase in tolerance to ultraviolet irradiation and NaCl. The results of bioassay showed reduction of virulence of Δ *Mrsp*s infecting *Galleria mellonella* under the conditions of topical inoculation and injection, and the LT₅₀s of insect infected by Δ *Mrsp*s were markedly longer than those of insect infected by the wild-type. Different fungal strains exhibited similar abilities on appressorium formation and cicada wing penetration, but the expression of the genes involved in hemocoel colonization were significantly downregulated after *Mrsp*s deletion. These results indicate that spermine synthase is involved in the regulation of development, stress response and pathogenicity of *M. robertsii*.

Keywords: *Metarhizium*; spermine synthase; development; stress response; pathogenicity

多胺是一类广泛存在于真核细胞内的生理活性物质,参与了细胞生长、增殖和分化等多种生物学过程(Pegg & Michael 2010)。真菌中普遍存在腐胺、亚精胺和精胺等多胺物质(Kummasook *et al.* 2013)。腐胺在亚精胺合成酶及精胺合成酶作用下合成精胺,精胺直接参与调控 RNA、DNA、蛋白质和其他酸性分子物质的合成,进而影响真菌生长代谢(Igarashi & Kashiwagi 2000; Dorighetto *et al.* 2018)。解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* 通过合成精胺调节活细胞内 H⁺-ATPase 活性和 H⁺泵出细胞效率,促进菌丝形态转变和菌落结构(Dorighetto *et al.* 2018)。在人致病真菌马尔尼菲青霉菌 *Penicillium marneffei* 中,敲除精胺合成酶后菌丝生长、分生孢子产生、孢子萌发和二态性转变等能力明显下降(Kummasook *et al.* 2013)。此外,精胺在植物病原真菌中也具有十分重要的作用,可直接参与稻瘟病菌的附着胞形成和体壁穿透(Rocha *et al.* 2020)。然而,截至目前在昆虫病原真菌的研究中未见精胺相关生物学功能的报道。

绿僵菌 *Metarhizium* 和白僵菌 *Beauveria* 等昆虫病原真菌寄主范围可达 50 科,能够侵染杀死 200 多种昆虫(Wang & Wang 2017)。由于昆虫病原真菌对寄主的致病具有专化性,对人畜和环境相对安全,在有害昆虫的生物防治中应用前景广阔(王露露等 2021)。其中绿僵菌具有典型

的真菌侵染阶段:体表识别附着、孢子萌发形成附着胞、体表穿透、寄主血腔内生长增殖及毒素分泌、寄主致死并穿出表皮和分生孢子扩散(Stone & Bidochka 2020)。当前,绿僵菌已被作为模式系统用以研究虫生真菌分子致病和真菌-昆虫互作机理(Gao *et al.* 2011)。然而,害虫致死时间长、抗逆性弱和仿效不稳定等缺点导致绿僵菌等虫生真菌市场份额较低。因此,当前有必要进一步深入研究虫生真菌致病机理,筛选关键毒力基因并探索其生物学功能。

本研究基于稻瘟病菌精胺合成酶的氨基酸序列(PoSPS) (Rocha *et al.* 2020),通过同源比对获得罗伯茨绿僵菌精胺合成酶 MAA_02088 (MrSPS)。通过根癌农杆菌介导的同源替换方法靶向敲除了 MrSPS 的编码基因,并进一步研究其在罗伯茨绿僵菌生长、产孢、抗逆和致病力过程中的作用,最终明确 MrSPS 在绿僵菌中的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株和供试昆虫

大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 TOP10 用于质粒 DNA 的转化,根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 AGL-1 用于真菌遗传转化,罗伯茨绿僵菌 *Metarhizium robertsii* 菌株 ARSEF 23 (ATCC No. MYA-3075)为原始菌株用于基因敲

除，均来源于安徽农业大学微生物防治重点实验室。含有草铵膦除草剂和苯菌膦抗性基因质粒 pDHt-SK-bar/ben 由中国科学院分子植物科学卓越创新中心惠赠。供试昆虫大蜡螟 5 龄幼虫购自上海瑞清钓饵公司。

1.1.2 培养基

PDA (potato dextrose agar)固体培养(Difco)、LB (Luria-Bertani)固体培养基(Solarbio)、MM (minimal medium)基本培养基(NaNO₃ 6 g/L, KCl 0.52 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.52g/L, KH₂PO₄ 0.25 g/L, 葡萄糖 10 g/L)、M-100 培养基(M-100 盐溶液 62.5 mL/L, 葡萄糖 10 g/L, KNO₃ 3 g/L, 琼脂 15 g/L)。

1.2 MrSPS 序列特征分析

根据稻瘟病菌精胺合成酶 PoSPS 的氨基酸序列(XP_003714219.1)，在罗伯茨绿僵菌基因组数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/13329>)中进行 BLAST 比对，获得同源序列(命名为 MrSPS)；随后在 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对 MrSPS 蛋白序列保守功能域进行预测、分析；利用 Mega7.0 软件构建 MrSPS 及近源物种同源蛋白系统发育树(Kumar *et al.* 2016)。

1.3 基因敲除/回补菌株的构建和鉴定

以罗伯茨绿僵菌菌株 ARSEF 23 的基因组

DNA 为模板进行 PCR 扩增，分别获得 *Mrsp*s 基因 5'端(1 126 bp)和 3'端(1 036 bp)的片段；利用一步克隆法将上游和下游片段连接到 *EcoR* I / *Bam*H I 酶切后的双元载体 pDHt-SK-bar，获得敲除质粒 pbar-SPS；将构建好的敲除质粒转化进入大肠杆菌 TOP10 中，测序连接序列正确后提取质粒，转化进入根癌农杆菌 AGL-1 中；通过农杆菌介导的遗传转化方法将敲除质粒转化进入绿僵菌中(Wang *et al.* 2017)，并通过含 250 mg/L 草铵膦的 M-100 培养基筛选基因敲除突变体。提取稳定遗传突变体 DNA 和 RNA，利用 PCR 对敲除菌株进行验证。PCR 扩增获得包括 *Mrsp*s 基因 5'端(1 169 bp)，全长编码序列(1 890 bp)和 3'端(1 045 bp)的片段，连接到苯菌膦抗性的双元载体 pDHt-SK-ben 以获得回补质粒 Com-pben-SPS；基于上述同源转化方法将回补质粒转化进入基因敲除突变体，筛选获得候选基因回补菌株。提取回补菌株 DNA 和 RNA，利用 PCR 对回补菌株进行验证。本研究涉及的引物见表 1。

1.4 荧光定量 PCR 分析

采用真菌 RNA 提取试剂盒(Omega)抽提绿僵菌 RNA。利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性，利用 cDNA 合成试剂盒(TaKaRa)反转 RNA 获得 cDNA。然后用 SYBR Green kit (TaKaRa)

表 1 本文所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

靶基因	引物序列	用途
Targeted genes	Sequence (5'→3') (F/R)	Purpose
<i>Mrsp</i> s	CACCACCCAAAGTCATCTAC/ATCGCCTCCTATCAGCA	Real-time PCR
<i>Mrsp</i> s	GGTTTATGGCGTCTTCG/TTGCTTGATAGTGCGGTAG	Validation of gene deletion
<i>Mrsp</i> s-5'	ATAGAGGAGCGATCATTTCGTCG/TGAGGTATCCTGAGCTGATGGAA	Amplify <i>Mrsp</i> s 5' flank sequence
<i>Mrsp</i> s-3'	ATGGGTGAGATTGGATGCCA/TTGACCTTTGGACCGTTGCT	Amplify <i>Mrsp</i> s 3' flank sequence
<i>Mrsp</i> s-full	ATAGAGGAGCGATCATTTCGTCG/TTGACCTTTGGACCGTTGCT	Amplify complemented sequence
<i>mcl</i> 1	CTCCAAGCCAACTCGC/GAGGAAGAGCATAGCCAC	Real-time PCR
<i>pac</i> C	GTTAGTGAAACCACCAGA/TTGACGAAATCCTTGC	Real-time PCR
<i>msn</i> 2	TGCCACAGACAGCTCAACA/CCAAATTCGGATTCCAACAT	Real-time PCR
<i>dtxs</i> 1	GGACCAAGGTTCTGACA/TGCGGCAAATCTATCTC	Real-time PCR
<i>snf</i> 1	ACGAGTACGACGGCACA/TCCCACCGCACTTTGA	Real-time PCR
<i>atm</i> 1	TGGGATGACGACAACCTGGC/CAATGGTGGCAAAGGACTGA	Real-time PCR

对目的基因进行荧光定量 PCR 分析。以 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (MAA_05302)基因作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行相对定量分析(Livak & Schmittgen 2001)。

1.5 不同菌株的表型分析

将菌株(WT、 $\Delta Mrsp$ s 和 $\Delta Mrsp$ s-*cp*)接种到 PDA 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,并稀释至浓度为 1×10^7 个/mL 备用。

1.5.1 生长发育分析

取 1 μ L 孢子悬浮液(1×10^7 个/mL)点接于 PDA 培养基中,28 °C 静置培养 10 d,每天用游标卡尺测量菌落直径。每个菌株 3 个重复,试验重复 3 次(下同)。

1.5.2 产孢量测定

取 40 μ L 孢子悬浮液(1×10^7 个/mL)均匀涂布于直径 3.5 cm 的 PDA 培养基中,28 °C 静置培养 14 d。用刀片将皿中所有孢子收集到 30 mL 吐温溶液中,充分振荡使孢子均匀分散,计算单位面积产孢量。

1.5.3 耐受能力的测定

取 1 μ L 孢子悬浮液(1×10^7 个/mL)分别点接于含刚果红(8 g/L)、 H_2O_2 (5 mmol/L)和 NaCl (1 mol/L)的 PDA 培养基中,以孢子悬浮液点接于 PDA 培养基为对照,28 °C 静置培养 14 d,用游标卡尺测量菌落直径。生长抑制率=(对照组直径-处理组直径)/对照组直径 $\times 100\%$ 。取 10 μ L 孢子悬浮液(1×10^6 个/mL)点接于 PDA 培养基中,分别进行杂交炉(Aanalytik Jena U)紫外照射(Energy 为 2, Time 为 1)和 42 °C 水浴热激 1 h,28 °C 静置培养 12–24 h,以未处理孢子悬浮液为对照,在显微镜下观察孢子萌发的情况,记录数据。萌发抑制率=(对照组萌发率-处理组萌发率)/对照组萌发率 $\times 100\%$ 。

1.6 不同菌株的致病力分析

1.6.1 致病力测定

每 30 只大蜡螟 5 龄幼虫为一组,分别浸入浓

度 1×10^7 个/mL 孢子悬浮液(20 mL)中 1.5 min,放置于干燥滤纸上自然晾干,放入铺有干净滤纸培养皿中,在湿度 80%、28 °C 条件下静置培养。以水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。取 5 μ L 孢子悬浮液(1×10^5 个/mL)注射至大蜡螟的第二腹足,放入铺有干净滤纸培养皿中,在湿度 80%、28 °C 条件下静置培养。以水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} (汪章勋等 2020)。每 30 只为一组,每个菌株 3 个重复,试验重复 3 次。

1.6.2 附着孢形成和穿透能力分析

将 30% H_2O_2 洗净的蝉翅置于 1×10^6 个/mL 孢子悬浮液中 1 min,滤纸吸干放入水琼脂平板上,微微按压后放入 28 °C 培养箱中培养 24 h,利用显微镜记录附着孢形成率。取 5 μ L 孢子悬浮液(10^5 个/mL)放置于蝉翅表面,将蝉翅放置于 PDA 培养基中 28 °C 培养 3 d,将蝉翅取走后培养基继续培养 3 d,观察菌落生长情况(Luo *et al.* 2020)。

2 结果与分析

2.1 MrSPS 的序列特征分析

*Mrsp*s 基因全长 1 890 bp,含有一个内含子,cDNA 全长 1 830 bp,编码 609 个氨基酸。而稻瘟病菌 *Posps* 基因全长 2 443 bp,含有两个内含子,cDNA 全长 1 785 bp,编码 594 个氨基酸。运用在线软件 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 分析发现, PoSPS 和 MrSPS 各含有一个 AdoMet_MTases 结构蛋白域,分别位于 281–482 和 347–497 氨基酸位点。与 PoSPS 相似, MrSPS 在 AdoMet_MTases 结构蛋白域内(351–399 氨基酸位点)含有一个 S-adenosylmethionine binding site 结构域(图 1A)。

基于氨基酸序列的同源比对分析显示，罗伯茨绿僵菌的 MrSPS 氨基酸序列与中国被毛孢 *Ophiocordyceps sinensis* 的 OsSPS 以 99% 的支持率聚为一支，同源性较高。与未检测到 S-adenosylmethionine binding site 结构域的黄曲霉 *Aspergillus flavus*、产黄青霉 *Penicillium chrysogenum* 和糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* 的 SPS 遗传距离较远(图 1A)。深入分析发现，罗伯茨绿僵菌含有可供 S-腺苷甲硫氨酸结合的 13 个保守氨基酸序列，进一步说明 MrSPS 与 PoSPS 类似，具有精胺合成酶的功能(图 1B) (Pegg & Michael 2010)。

2.2 不同时期 MrSPS 转录水平

MrSPS 在罗伯茨绿僵菌纯孢子和萌发时期 (36 h) 表达量最高，菌丝生长至 60 h 表达量下

降，在 120 h 表达量上升(图 2A)。相较于黏附于体表的孢子，侵染过程中 MrSPS 表达量升高，进一步分析表明在附着胞形成阶段(24 h) MrSPS 表达量最高，体壁穿透阶段(48 h) 低于昆虫血腔定殖阶段(96 h) ($P<0.05$) (图 2B)。

2.3 MrSPS 敲除突变体的获得及验证

根据同源重组原理敲除 MrSPS 基因，敲除策略见图 3A。构建 MrSPS 基因敲除载体 pbar-SPS，基于农杆菌介导的遗传转化获得 MrSPS 基因敲除菌株 (Δ MrSPS，即 Δ)。构建回补质粒 com-pben-SPS，采用农杆菌介导的遗传转化方法获得回补菌株 (Δ MrSPS-cp，即 CP)。提取不同突变株基因组 DNA 和总 RNA，分别在基因和转录水平验证 MrSPS 基因已被成功敲除或回补(图 3B)。

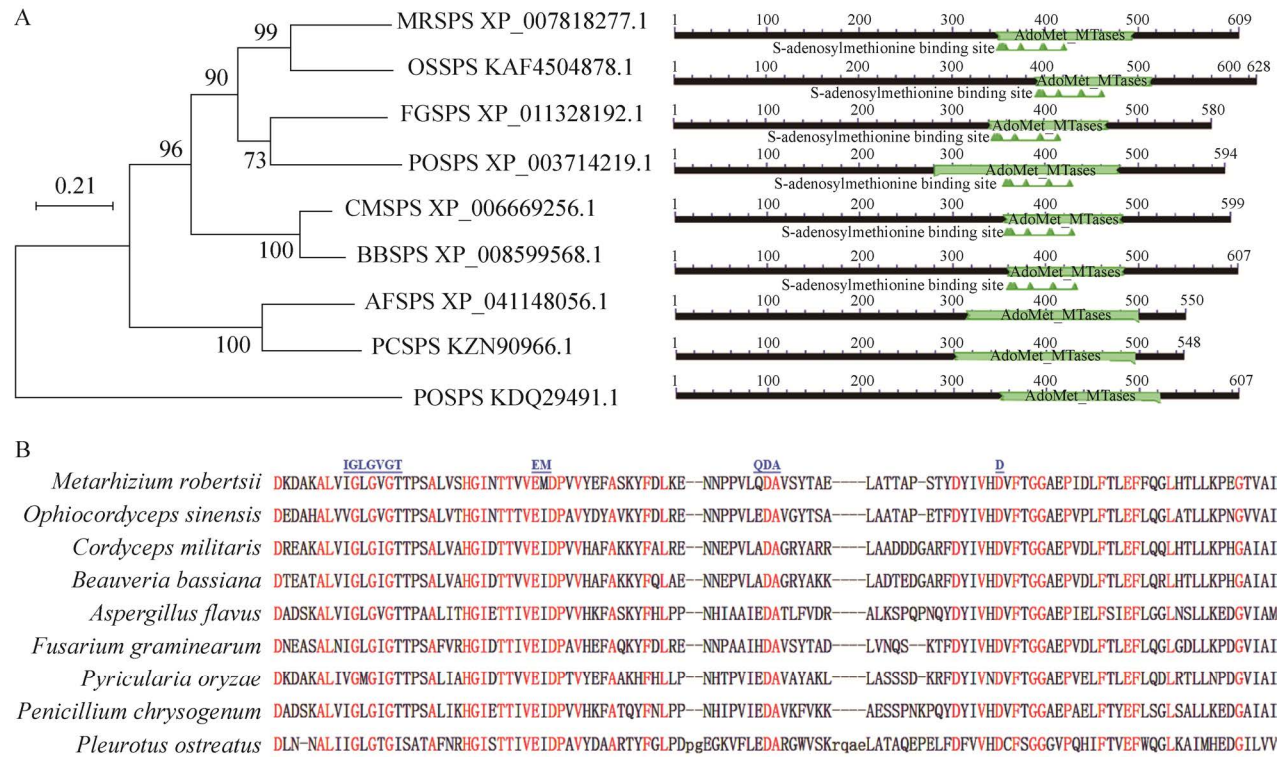


图 1 MrSPS 系统发育与氨基酸序列分析 A: MrSPS 系统发育以及结构域预测分析; B: MrSPS 氨基酸序列分析. 序列上方标记的氨基酸为保守氨基酸序列

Fig. 1 Phylogenetic and amino acid sequence analysis of MrSPS. A: Phylogenetic analysis and domain prediction of MrSPS; B: Amino acid sequence analysis of MrSPS. The amino acids marked above the sequence are conserved amino acid sequences.

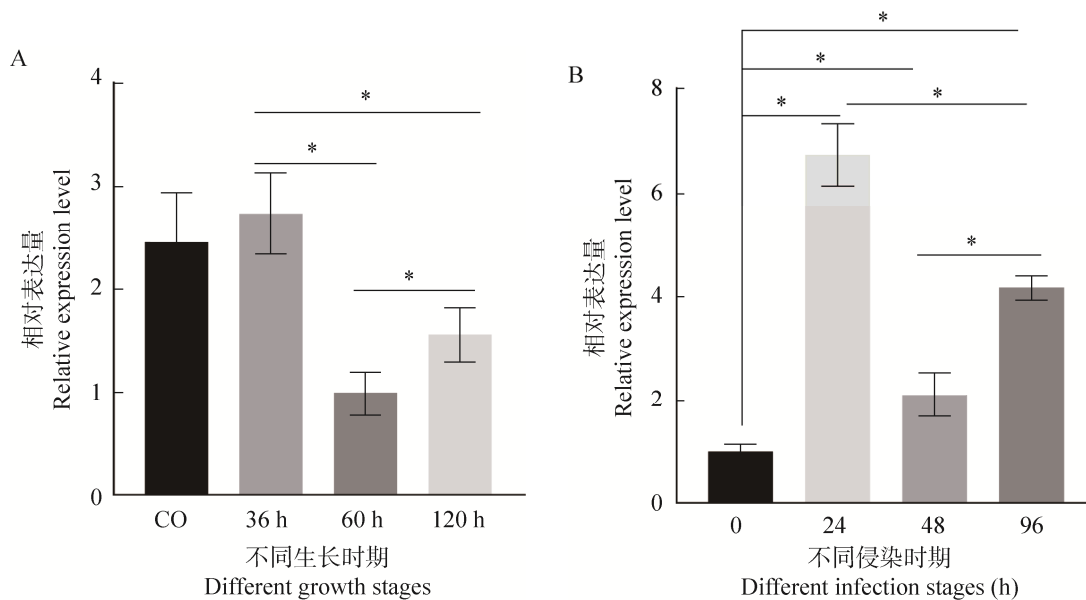


图2 *MrspS* 在不同生长和侵染时期表达量 A: *MrspS* 在不同无性生长时期表达量; B: *MrspS* 在侵染大蜡螟幼虫不同阶段表达量. CO: 无性孢子; *表示处理间数据差异显著, $P < 0.05$

Fig. 2 Transcriptional profiling of *MrspS* during different developmental and infection stages of *Metarhizium robertsii*. A: Expression of *MrspS* at different asexual developmental stages; B: Expression of *MrspS* at different *Galleria mellonella* infected stages. CO: Conidia; * Indicated data were significant difference between treatments ($P < 0.05$).

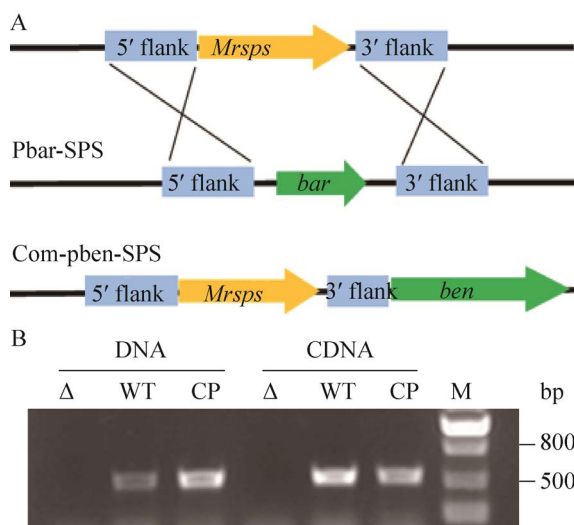


图3 *MrspS* 基因敲除和回补突变体的获得 A: 基因敲除与回补载体的构建策略图; B: 突变体的验证

Fig. 3 Gene deletion and complementation of *MrspS*. A: Strategy diagram for the construction of *MrspS* deletion and complementation. B: The confirmation of different mutants; Δ : $\Delta MrspS$; WT: Wild type; CP: $\Delta MrspS$ -cp.

2.4 *MrspS* 敲除对绿僵菌生长发育和抗逆能力的影响

PDA 培养基培养第 10 天, 突变体的菌落直径为 34.45 mm, 菌落直径小于野生型(42.36 mm)和回补菌株(43.63 mm)的菌落直径(图 4A)。PDA 培养基培养第 14 天, 与 WT(3.96×10^7 个/cm²)和 $\Delta MrspS$ -cp (3.26×10^7 个/cm²)相比较, $\Delta MrspS$ (4.16×10^7 个/cm²)在 14 d 后的产孢明显减少 ($P < 0.05$, 图 4B)。以上结果说明 MrSPS 参与调控罗伯茨绿僵菌的生长和产孢。

在添加 H₂O₂ 和刚果红的 PDA 中, WT、 $\Delta MrspS$ -cp 和 $\Delta MrspS$ 菌株菌丝生长的抑制率无显著差异(图 4C)。在添加 NaCl 的 PDA 中, $\Delta MrspS$ (18.65%)生长抑制率显著低于 WT (22.56%)和 $\Delta MrspS$ -cp (21.97%), 表明 MrSPS 敲除后菌株渗透压耐受性增强。与 WT 和 $\Delta MrspS$ -cp 相比较, $\Delta MrspS$ 孢子热激后萌发抑制率无明显变化, 但是紫外照射后萌发抑制率显著降低,

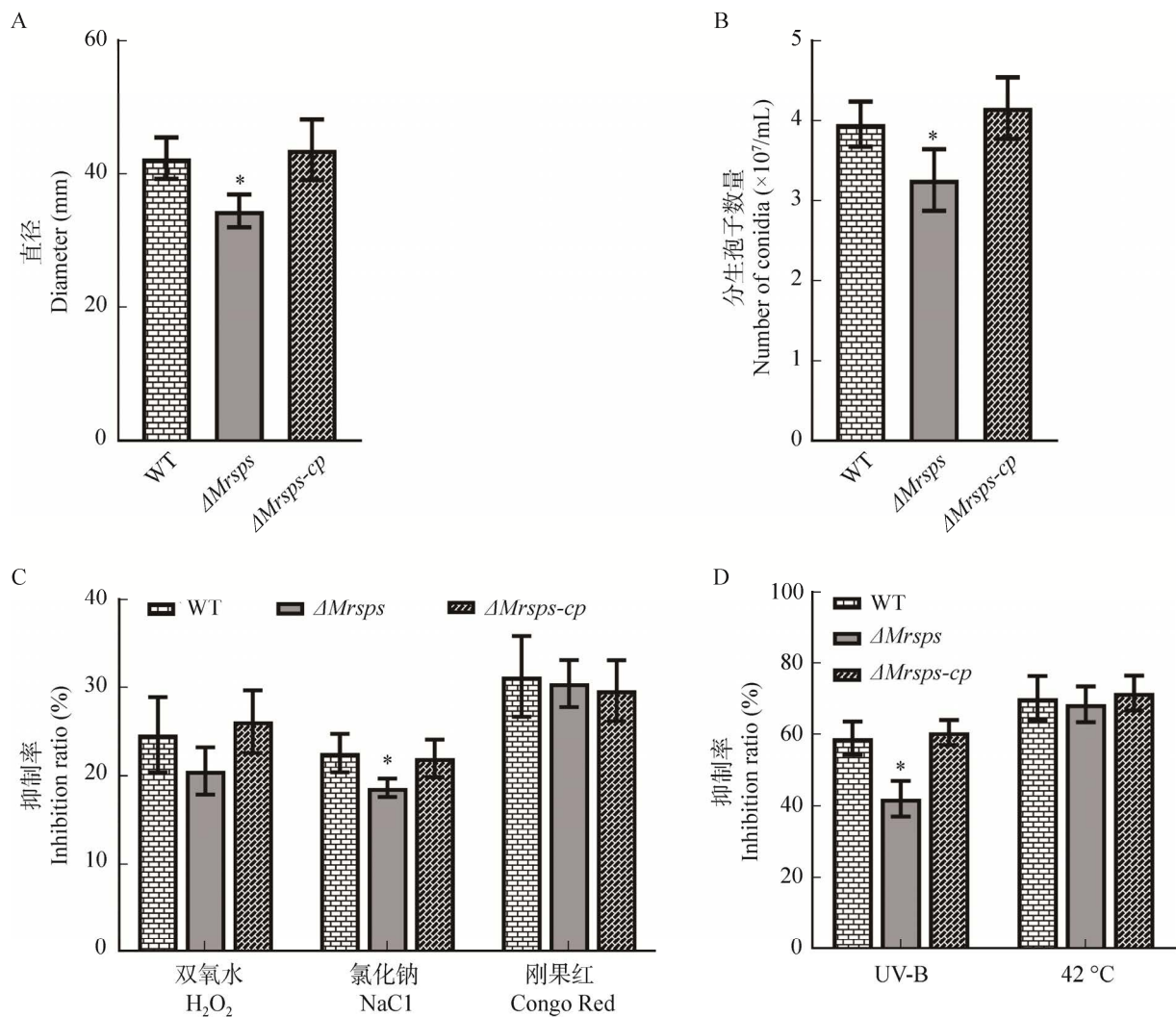


图 4 *MrspS* 敲除对绿僵菌生长发育和抗逆能力的影响 A: 不同菌株在 PDA 上培养 10 d 的菌落直径; B: 不同菌株在 PDA 上培养 14 d 的产孢量; C: 菌株在添加双氧水、氯化钠和刚果红的 PDA 培养基上生长抑制率; D: 紫外照射和热激后不同菌株孢子萌发抑制率. *表示处理间数据差异显著, $P<0.05$

Fig. 4 Effects of *MrspS* deletion on growth, conidiation and stress resistance of *Metarhizium robertsii*. A: Statistical analysis of colony diameters on PDA in 10 d; B: Statistical analysis of conidial yields on PDA in 14 d; C: Growth inhibition rate of WT, $\Delta MrspS$ and $\Delta MrspS-cp$ strains on PDA containing H₂O₂, NaCl or Congo red; D: Germination inhibition ratio of fungal conidia after exposure to heat stress and UV-B treatment. * Significantly different expression between treatments ($P<0.05$).

降低约 28.56% (图 4D)。

2.5 *MrspS* 敲除导致绿僵菌致病力显著下降

为了探究 MrSPS 是否参与调节罗伯茨绿僵菌的致病力, 收集野生型和突变株分生孢子, 通过浸渍和注射的方法接种大蜡螟。结果发现: 在体壁侵染接种的情况下, $\Delta MrspS-cp$ 幼虫

致死能力下降($P<0.05$); 与 WT (5.17 d) 和 $\Delta MrspS-cp$ (5.38 d) 相比, $\Delta MrspS$ (6.71 d) 的半数致死时间 LT_{50} 增长(图 5A)。在直接注射接种情况下, 敲除 *MrspS* 基因后的罗伯茨绿僵菌致病力显著下降($P<0.05$), LT_{50} 由 WT (4.19 d) 增长至 $\Delta MrspS$ (4.75 d) (图 5B)。

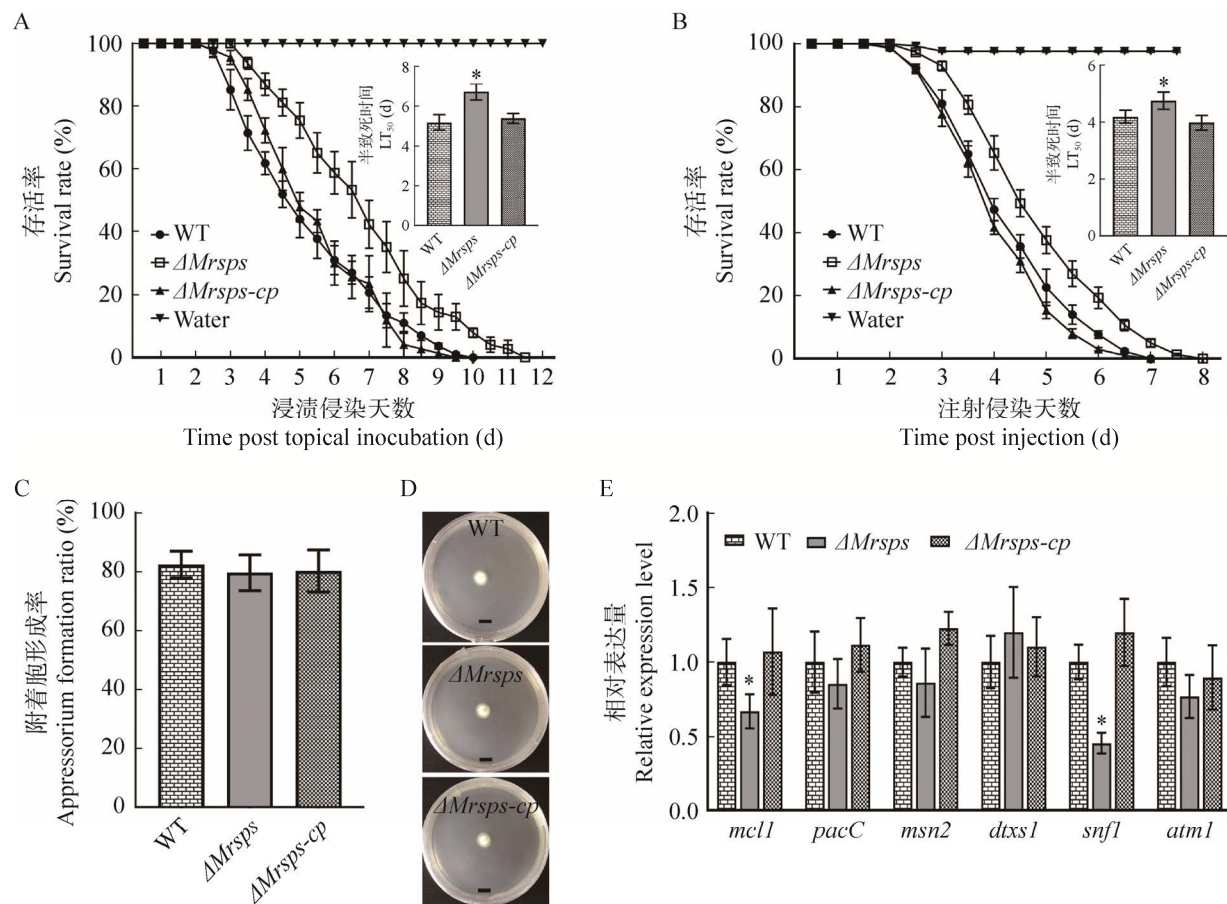


图 5 *MrSPS* 基因敲除对绿僵菌致病力的影响 A: 浸渍感染法测定大蜡螟存活率和 LT_{50} ; B: 注射感染法测定大蜡螟存活率和 LT_{50} ; C: 附着孢诱导形成率; D: 不同菌株的蝉翅穿透力检测; E: 血腔定殖相关基因的表达量. *表示处理间数据差异显著, $P < 0.05$; *mcl1*: 免疫逃避蛋白; *pacC*: PH 调节蛋白; *msn2*: 锌指结构域蛋白; *dtxs1*: 破坏素合成酶; *snf1*: 蔗糖非发酵蛋白激酶; *atm1*: 酸性海藻糖酶

Fig. 5 Impact of *MrSPS* deletion on fungal virulence of *Metarhizium robertsii*. A: Survival rate of infected *Galleria mellonella* and LT_{50} of *Metarhizium robertsii* infection under topical inoculation condition; B: Insect survival and LT_{50} under direct injection condition; C: Percentage of appressoria formation; D: Ability of fungal penetration to cicada wings; E: Expression levels of hemocoel colonization-associated genes. * Significantly different expression between treatments ($P < 0.05$); *mcl1*: Collagen-like protein; *pacC*: PH regulatory protein; *msn2*: Zinc finger domain-containing protein; *dtxs1*: Destruxin synthetase; *snf1*: Sucrose-nonfermenting protein kinase; *atm1*: Acid trehalase.

为了进一步探析 MrSPS 调控罗伯茨绿僵菌致病的具体阶段, WT、 $\Delta MrSPS$ -cp 和 $\Delta MrSPS$ 菌株附着孢形成率和蝉翅穿透能力进行了测定。结果显示: WT、 $\Delta MrSPS$ -cp 和 $\Delta MrSPS$ 附着孢形成率没有明显差别, 且在 3 d 内都能够穿透蝉翅并在 PDA 上正常生长(图 4C, 4D)。测定在幼虫血腔内的罗伯茨绿僵菌定殖相关基因表达量显

示, $\Delta MrSPS$ -cp 中编码 Collagen-like protein (*mcl1*) 和 Sucrose-nonfermenting protein kinase (*snf1*) 的基因表达量低于 WT 和 $\Delta MrSPS$ -cp 中基因的表达量($P < 0.05$, 图 5E)。结合上述实验结果, 本研究认为, 在罗伯茨绿僵菌致病过程中, MrSPS 主要通过影响免疫逃避和糖源利用过程在血腔定殖阶段发挥作用。

3 讨论

由于早期人们认为绝大部分真菌缺失精胺合成酶不能合成精胺,且精胺对于真菌正常生长无影响,因此相对于动植物,真菌中精胺和精胺合成酶的研究较少(Nickerson *et al.* 1977; Pegg 2014)。基于已知的稻瘟病菌精胺合成酶,本研究从罗伯茨绿僵菌中鉴定了一个精胺合成酶 MrSPS,分析发现黄曲霉、产黄青霉和平菇中都含有精胺合成酶,且共同含有精胺合成酶行使功能所必需的 AdoMet_MTases 结构蛋白域,表明精胺合成酶广泛存在于不同真菌中(Rocha *et al.* 2020)。在稻瘟病菌中,精胺合成酶参与附着胞的形成与附着,本研究系统发育树显示罗伯茨绿僵菌与中国被毛孢精胺合成酶序列同源性最高,但与其他昆虫病原真菌(蛹虫草和白僵菌)同源性低,与植物病原真菌(禾谷镰刀菌和稻瘟病菌)同源性高,可能是由于精胺合成酶与真菌附着胞形成存在协同进化导致能够产生附着胞的真菌精胺合成酶同源性较高(裴炎等 2003; 王定锋等 2010; 高芬等 2014; Rocha *et al.* 2020)。

菌丝生长和分生孢子产生对于昆虫病原真菌的侵染循环具有十分重要的作用。本研究发现,敲除 MrSPS 后罗伯茨绿僵菌的菌丝生长速率和产孢量下降,而在稻瘟病菌的研究中发现 PoSPS 敲除后并不影响生长和产孢,这表明精胺合成酶在不同的病原真菌中调控真菌生长和产孢功能并不完全相同(Rocha *et al.* 2020)。值得注意的是,黄曲霉中突变精胺合成途径中的亚精胺合成酶后,其生长和产孢能力显著下降,表现性状与本研究中的 $\Delta MrSPS$ 类似,暗示精胺的多少可能对于罗伯茨绿僵菌和黄曲霉的生长和产孢有着类似影响(Majumdar *et al.* 2018)。

精胺直接参与植物渗透调节、生物大分子

保护和多胺临时存储等,进而对于植物的抗逆起着重要作用(李霞等 2018)。目前针对精胺在真菌抗逆过程中作用研究较少,仅在丛枝菌根真菌中有报道,表明低浓度的精胺显著增加孢子菌丝的生长点个数,进而提高逆境中孢子的萌发率(邓森汐等 2014)。添加 NaCl 的 PDA 中, *MrSPS* 敲除株生长抑制率比野生型低,表明 MrSPS 敲除后菌株渗透压耐受性增强,与植物类似,精胺可能参与罗伯茨绿僵菌渗透调节(Roy & Wu 2002; 刘俊等 2005; Sudhakar *et al.* 2015)。

在稻瘟病菌中, PoSPS 的缺失使附着胞分泌物(主要为精胺)减少,导致附着胞粘附寄主体表能力下降,同时附着胞无法定向产生侵染钉,致使不能够穿透寄主体表(彭陈等 2011; Rocha *et al.* 2020)。不同的是, *MrSPS* 的敲除并没有影响罗伯茨绿僵菌的蝉翅穿透能力,这存在两种可能: 1) 不同病原真菌中精胺合成酶作用模式不一致; 2) 蝉翅不能有效模拟昆虫体壁,因此 MrSPS 的缺失不影响罗伯茨绿僵菌对蝉翅的穿透。免疫逃避蛋白 MCL1 在血腔定殖过程中通过包裹罗伯茨绿僵菌进而保护其受到昆虫免疫系统的攻击, *MrSPS* 的敲除显著下调了 *mcl1* 基因的表达,说明精胺可能在罗伯茨绿僵菌免疫逃避过程中发挥作用(Wang & St Leger 2006)。此外, SNF1 直接参与绿僵菌在昆虫血腔中碳源的利用, *MrSPS* 的敲除导致 *snf1* 表达量下调,说明精胺合成酶与罗伯茨绿僵菌在昆虫血腔中碳源吸收利用相关(Ming *et al.* 2014; Xie *et al.* 2020)。

综上所述,本研究从罗伯茨绿僵菌中鉴定到一个精胺合成酶(MrSPS),研究发现 MrSPS 参与调控罗伯茨绿僵菌的生长与产孢、外界胁迫应答以及致病力等多种生物学功能,研究结果为提高绿僵菌等真菌杀虫剂的防治效果和田间适应性提供了基础。

[REFERENCES]

- Deng MX, Tang B, Huang LP, Jiang L, 2014. Research on factors affecting spore germination of AM fungi. Journal of Guizhou University, 31(6): 38-41 (in Chinese)
- Dorighetto Cogo AJ, Dutra Ferreira KDR, Okorokov LA, Ramos AC, Façanha AR, Okorokova-Façanha AL, 2018. Spermine modulates fungal morphogenesis and activates plasma membrane H⁺-ATPase during yeast to hyphae transition. Biology Open, 7(2): bio.029660
- Gao F, Chu JM, Li JH, Wang ML, 2014. Research progress in the pathogenesis of plant pathogenic fungi. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 30(5): 1174-1179 (in Chinese)
- Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, Shang Y, Duan Z, Hu X, Xie XQ, Zhou G, Peng G, Luo Z, Huang W, Wang B, Fang W, Wang S, Zhong Y, Ma LJ, St Leger RJ, Zhao GP, Pei Y, Feng MG, Xia Y, Wang C, 2011. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLoS Genetics, 7(1): e1001264
- Igarashi K, Kashiwagi K, 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. Biochemical and Biophysical Research Communications, 271(3): 559-564
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870-1874
- Kummasook A, Cooper CR JR, Sakamoto A, Terui Y, Kashiwagi K, Vanittanakom N, 2013. Spermidine is required for morphogenesis in the human pathogenic fungus, *Penicillium marneffei*. Fungal Genetics and Biology, 58-59: 25-32
- Li X, Cheng YH, Ma XD, Han L, Sun ZY, 2018. Physiological mechanism of polyamines in plant resistance. World Forestry Research, 2018(4): 23-28 (in Chinese)
- Liu J, Zhang YY, Zhang WH, Liu YL, 2005. Relationship between the levels and conversion of polyamines in the roots and salt tolerance in barley seedlings. Journal of Nanjing Agricultural University, 28(2): 7-11 (in Chinese)
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. Methods, 25(4): 402-408
- Luo F, Zhou H, Zhou X, Xie X, Li Y, Hu F, Huang B, 2020. The intermediates in branched-chain amino acid biosynthesis are indispensable for conidial germination of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. Applied and Environmental Microbiology, 86(20): e01682-20
- Majumdar R, Lebar M, Mack B, Minocha R, Minocha S, Carter-Wientjes C, Sickler C, Rajasekaran K, Cary JW, 2018. The *Aspergillus flavus* spermidine synthase (*spds*) gene, is required for normal development, aflatoxin production, and pathogenesis during infection of maize kernels. Frontiers in Plant Science, 9: 317
- Ming Y, Wei Q, Jin K, Xia Y, 2014. *MaSnf1*, a sucrose non-fermenting protein kinase gene, is involved in carbon source utilization, stress tolerance, and virulence in *Metarhizium acridum*. Applied Microbiology and Biotechnology, 98(24): 10153-10164
- Nickerson KW, Dunkle LD, van Etten JL, 1977. Absence of spermine in filamentous fungi. Journal of Bacteriology, 129(1): 173-176
- Pegg AE, 2014. The function of spermine. IUBMB Life, 66(1): 8-18
- Pegg AE, Michael AJ, 2010. Spermine synthase. Cellular and Molecular Life Sciences, 67(1): 113-121
- Pei Y, Fang WG, Zhang YJ, 2003. Mechanism of fungal pathogenesis in insect and strain improvement by gene engineering. Journal of Agricultural Biotechnology, 11(3): 221-226 (in Chinese)
- Peng C, Chen HL, Zhang YQ, Guo SW, 2011. A review on appressorium initiation and development in *Magnaporthe oryzae*. Microbiology China, 38(8): 1270-1277 (in Chinese)
- Rocha RO, Elowsky C, Pham NTT, Wilson RA, 2020. Spermine-mediated tight sealing of the *Magnaporthe oryzae* appressorial pore-rice leaf surface interface. Nature Microbiology, 5(12): 1472-1480
- Roy M, Wu R, 2002. Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. Plant Science, 163(5): 987-992
- Stone LBL, Bidochka MJ, 2020. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 104(23): 9935-9945
- Sudhakar C, Veeranagamallaiah G, Nareshkumar A, 2015. Polyamine metabolism influences antioxidant defense mechanism in foxtail millet (*Setaria italica* L.) cultivars with different salinity tolerance. Plant Cell Reports, 34(1): 141-156
- Wang C, St Leger RJ, 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. Proceedings of the National Academy of Science, 103(17): 6647-6652
- Wang C, Wang S, 2017. Insect pathogenic fungi: genomics, molecular interactions, and genetic improvements. Annual Review of Entomology, 62: 73-90
- Wang DF, Zeng MS, Wang QS, Wu GY, 2010. Biochemical

and molecular bases of stress-tolerance of entomogenous fungi and their application. *Biotechnology Bulletin*, 2010(10): 49-54 (in Chinese)

Wang LL, Wang H, Xiong Y, Zhou X, Wang J, Wang JH, Wu SR, 2021. Advances in the control of crop pests by using entomopathogenic fungi. *Journal of Tropical Biology*, 12: 1-6 (in Chinese)

Wang Y, Wang T, Qiao L, Zhu J, Fan J, Zhang T, Wang ZX, Li W, Chen A, Huang B, 2017. DNA methyltransferases contribute to the fungal development, stress tolerance and virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10): 4215-4226

Wang ZX, Xu XZ, Feng JY, Zhou Q, Huang B, 2020. *MrXrn1* involved in the regulation of conidiation and pathogenicity in *Metarhizium robertsii*. *Chinese Journal of Biological Control*, 36(5): 721-728 (in Chinese)

Xie X, Wang Y, Yu D, Xie R, Liu Z, Huang B, 2020. DNMI, a dynamin-related protein that contributes to endocytosis and peroxisome fission, is required for the vegetative growth, sporulation, and virulence of *Metarhizium robertsii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(17): e01217-e012120

[附中文参考文献]

邓森汐, 唐兵, 黄丽萍, 江龙, 2014. 影响 AM 真菌孢子萌发因素的研究. *贵州大学学报*, 31(6): 38-41

高芬, 褚建梅, 李静虹, 王梦亮, 2014. 植物病原真菌致病机理研究进展. *江苏农业学报*, 30(5): 1174-1179

李霞, 程运河, 马晓东, 韩蕾, 孙振元, 2018. 多胺在植物抗逆中的生理机制. *世界林业研究*, 2018(4): 23-28

刘俊, 张艳艳, 章文华, 刘友良, 2005. 大麦根中多胺含量和转化与耐盐性的关系. *南京农业大学学报*, 28(2): 7-11

裴炎, 方卫国, 张永军, 2003. 昆虫病原真菌致病寄主的机制和基因工程改良. *农业生物技术学报*, 11(3): 221-226

彭陈, 陈洪亮, 张玉琼, 郭士伟, 2011. 稻瘟菌附着胞形成和发育的研究进展. *微生物学通报*, 38(8): 1270-1277

王定锋, 曾明森, 王庆森, 吴光远, 2010. 虫生真菌抗逆的生化分子基础及利用. *生物技术通报*, 2010(10): 49-54

王露露, 王辉, 熊焰, 周霞, 王军, 王健华, 伍苏然, 2021. 虫生真菌防治农作物害虫研究进展. *热带生物学报*, 12: 1-6

汪章勋, 徐秀珍, 冯健雨, 周权, 黄勃, 2020. *MrXrn1* 基因参与调控罗伯茨绿僵菌的产孢和致病. *中国生物防治学报*, 36(5): 721-728