



全基因组预测分析爪哇虫草菌候选 效应因子

雷妍圆¹, HUSSIN Abid², 武淑文³, 官昭瑛⁴, 许建新⁴,
JALEEL Waqar¹, 李怡峰^{1*}

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所/广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640; 2. 沙特阿拉伯环境、水和农业部, 沙特阿拉伯利雅得 11442; 3. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 4. 深圳城市职业学院, 深圳 518116)

摘要: 爪哇虫草菌 *Cordyceps javanica* 是一种广谱性生防真菌, 可防治多种农林害虫。效应因子在真菌致病寄主昆虫过程中发挥重要作用。本研究基于公布的爪哇虫草菌全基因组信息, 对其中预测的 11 142 个蛋白序列进行筛选, 以寻找其候选效应因子并进行功能分析。通过依次使用 SignalP v5.0、TMHMM v2.0、TargetP v2.0 和 Protcomp v9.0 等生物信息学工具进行预测, 筛选出 611 个可能位于细胞质中的蛋白, 并进一步分析了其中 348 个半胱氨酸含量较高的蛋白序列及 117 个具有串联重复单元的蛋白。通过比对病原物-寄主互作数据库 (PHI-base), 从鉴定出的 57 个具有注释的蛋白筛选出 10 个候选效应因子。最终, 基于突变表型预测, 筛选出 4 个与致病性相关的细胞质效应因子, 并通过实时荧光定量 PCR 技术研究了两个效应因子编码基因 (细胞壁蛋白 TQW04886 和疏水蛋白 TQW02068) 在爪哇虫草菌营养至生殖生长转变过程中的表达特征, 结果表明这两个效应因子主要在产孢阶段高表达。本研究不仅为深入理解爪哇虫草菌与寄主昆虫互作的分子机制提供了基础, 也为其他昆虫病原真菌效应因子的预测提供了参考。

关键词: 爪哇虫草菌; 全基因组; 候选效应因子; 预测

中图分类号: Q968.1;

文献标识码: A

Prediction and analysis of candidate effectors from the genome of *Cordyceps javanica*

LEI Yan-Yuan¹, HUSSIN Abid², WU Shu-Wen³, GUAN Zhao-Ying⁴, XU Jian-Xin⁴, JALEEL Waqar¹, LI Yi-Feng^{1*}(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection/Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. Ministry of Environment, Water and Agriculture, Riyadh 11442, Saudi Arabia; 3. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. School of Applied Biology, Shenzhen City Polytechnic, Shenzhen 518116, China)

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFD1401200); 广东省普通高校工程技术研究中心项目 (2024GCZX016); 广东省科技计划 (2020A1414010040); 深圳城市职业学院科研项目 (2214007, 2311008)

作者简介: 雷妍圆, 女, 博士, 副研究员, 主要从事真菌-昆虫互作机理研究, E-mail: leiyy@gdpri.com

*通讯作者 Author for correspondence: 李怡峰, 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为作物抗性遗传改良, E-mail: yifengli@gdaas.cn

收稿日期 Received: 2024-11-28; 修回日期 Revision received: 2025-01-10; 接受日期 Accepted: 2025-01-14

Abstract: *Cordyceps javanica*, a broad-spectrum insecticidal fungus, is extensively utilized to counteract agricultural and forest pests. Effectors are crucial in the interactions between entomopathogenic fungi and their host insects. Candidate effectors were predicted and analyzed from 11142 proteins in the whole genome of *C. javanica* using bioinformatics software, including SignalP v5.0, TMHMM v2.0, TargetP v2.0, and Protcomp v9.0. A total of 611 protein sequences were localized in the cytoplasm. Subsequent screening unveiled 348 sequences with a high cysteine content and 117 proteins featuring repeated sequences. A total of 57 protein sequences were compared with the pathogen-host interaction (PHI) database and identified. Protein sequences of less than 300 amino acids were selected, and among these, 10 candidate effectors were identified. Finally, four proteins were selected as putative effectors from *C. javanica* based on mutant phenotypes. The expression patterns of genes encoding secreted proteins (the cell wall protein TQW04886 and the hydrophobic protein TQW02068) during the transition from vegetative to reproductive growth were investigated by quantitative real-time PCR. The results showed that these two genes were highly expressed in *C. javanica* during the sporulation stage. This study lays the foundation for a better understanding of the role of effectors in the interaction between the pathogen *C. javanica* and its host, and provides reference for the prediction and analysis of effectors in other entomopathogenic fungi.

Key words: *Cordyceps javanica*; genome; candidate effectors; prediction

爪哇虫草菌 *Cordyceps javanica* 是隶属于虫草属的一种重要的生防真菌。该菌在全球范围内具有广泛的地理分布，能够寄生多种农林害虫（Avery *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023; 雷妍圆等, 2024）。鉴于其在环境友好和可持续害虫管理方面的独特优势，爪哇虫草菌被用于害虫防治，且已有商品化的真菌杀虫剂（李洋, 2021）。但这些杀虫剂的效果仍受到环境因素和定殖能力的影响，导致在实际应用中存在见效慢和防效不稳定的问题，限制了其规模化应用。生防真菌侵染寄主的过程是一个旨在克服寄主体内外防御机制的过程（Ortiz-Urquiza and Keyhani, 2013），这些真菌通过分泌一系列活性效应因子，即效应蛋白或效应子，来促进其侵染和定殖。这些效应因子通常是小型分泌蛋白，具有多种生物活性，其功能包括抑制宿主的免疫反应、夺取营养、隐藏自身、干扰宿主的生长发育以及直接杀死宿主细胞等。在植物与病原菌的相互作用研究中，这些效应因子被认为是干扰植物免疫应答的关键因素，而在更广泛的意义上，它们在病原物与寄主的相互作用中扮演着重要角色（陈继圣等, 2006; Jones and Dangl, 2006; 田李等, 2011; Ramachandran *et al.*, 2017; 董章勇等, 2019）。

以爪哇虫草菌为例，作为一种昆虫病原真菌，研究其效应因子对于揭示其致病机制和挖掘其应用潜力至关重要。根据真菌效应因子的保守基序，这些蛋白大多属于分泌蛋白，并具有以下特征：（1）高度特异性；（2）氨基酸残基序列长度通常在 50~300 个氨基酸之间；（3）含有 N-端信号肽编码序列，但缺乏跨膜区和 GPI 锚定位点；（4）富含半胱氨酸残基（Jones and Dangl, 2006; Bolton *et al.*, 2008; Stergiopoulos and de Wit, 2009）。真菌效应

因子通过靶向抑制宿主中的防御相关基因表达来促进侵染,而少数则通过激活寄主的易感基因表达来增加寄主的感病性 (Zhu *et al.*, 2023)。大多数效应因子在寄生早期被诱导表达,展现出多样性 (Cheng *et al.*, 2010; O'Connell *et al.*, 2012; Kleemann *et al.*, 2012), 例如,拟轮枝镰孢菌 *Fusarium verticillioides* 和链格孢菌 *Alternaria alternata* 产生的次生代谢物 (如伏马菌素和 AAL 毒素) 能够破坏宿主的鞘脂代谢并引发细胞死亡 (Yamagishi *et al.*, 2006)。灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 则利用转座子衍生的小 RNA 来干扰植物防御基因的表达 (Porquier *et al.*, 2021)。此外,多种果胶解聚酶,如聚半乳糖醛酸酶、果胶裂解酶和果胶甲基酯酶,已被证实为大多数真菌致病过程中必需的重要毒力因子 (ten Have *et al.*, 1998; Yakoby *et al.*, 2000; Isshiki *et al.*, 2001; Oeser *et al.*, 2002; Valette-Colle *et al.*, 2003)。由于真菌的高度分化以及其效应因子的初级氨基酸序列的高度特异性,这些序列与现有数据库中的条目通常缺乏显著同源性,这增加了跨物种鉴定的难度,并使得确定其生化功能变得更加复杂 (Padliya *et al.*, 2006; Cornell *et al.*, 2007)。

随着高通量测序技术和生物信息学的发展,真菌全基因组序列的释放,为开展包括爪哇虫草菌在内的重要生防真菌效应因子预测提供了便利 (Lin *et al.*, 2019)。在本研究中,我们根据已公布的爪哇虫草菌全基因组数据,选取基因组预测得到的 11142 个蛋白序列作为研究对象。依据效应因子的典型特征,运用生物信息学工具对这些候选效应因子进行了预测和分析。这项工作不仅为深入筛选和功能研究该菌的效应因子提供了坚实的基础,而且对于进一步揭示这些效应因子在病原真菌与寄主相互作用中的作用机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 爪哇虫草菌基因组数据来源

从 NCBI 数据库爪哇虫草全基因组 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_006981975.1/) 数据中下载到 11 142 条蛋白质的氨基酸序列。

1.2N-端信号肽预测

利用 SignalP v5.0 进行氨基酸信号肽的预测 (Petersen *et al.*, 2011), 基于多种人工神经网络算法 (Artificial neural networks) 和隐马可夫模型 (Hidden markov models) 预测给定氨基酸序列中的潜在信号肽剪切位点及其存在的具体位置,获得预测蛋白的 C 值、S 值、Y 值、mean S 和 D 值,其中 D 值可以区分信号肽和非信号肽,而信号肽剪切位点则位于预测的含有信号肽蛋白的 Y 曲线的最大值处 (Barash *et al.*, 2002)。

1.3 跨膜结构域预测

利用 TMHMM v2.0 对蛋白的跨膜结构域预测 (Krogh *et al.*, 2001), 预测蛋白跨膜螺旋的数量和跨膜区氨基酸长度,同时给出蛋白长度值、前 60 个氨基酸所预测跨膜螺旋数、及拓扑结构等参数,排除具有跨膜螺旋结构的蛋白。

1.4 胞外蛋白预测

利用 TargetP v2.0 预测蛋白是否含有转运肽，确定所预测蛋白的细胞定位情况（Emanuelsson *et al.*, 2007），归属为线粒体靶向肽（MTP）、叶绿体转运肽（CTP）或分泌途径的信号肽（SP）等，以明确哪些蛋白位于胞内细胞器，筛选出定位于胞外的蛋白。

1.5 亚细胞定位预测

对含 N-端信号肽的蛋白质序列，利用 ProtComp v9.0 对蛋白的亚细胞定位进行预测（Emanuelsson *et al.*, 2000），蛋白按以下归属进行划分：细胞核、质膜、胞外分泌、细胞质、线粒体、内质网、过氧化物酶体、溶酶体和高尔基体等，最终获得蛋白质的定位情况。

1.6 分泌组蛋白的半胱氨酸含量和串联重复序列分析

将 1.5 中获得的蛋白质序列，进行半胱氨酸（Cysteine）含量及多串联重复序列（Multiple tandem repeats）分析。使用 Perl 程序来计算半胱氨酸含量大于 6 的蛋白序列，采用 T-Reks (<http://bioinfo.montp.cnrs.fr/?r=t-reks/>) 进行多个串联重复序列分析（Jorda and Kajava, 2009）。

1.7 爪哇虫草菌致病相关候选效应因子预测

病原菌-寄主互作是生物学研究的重要方向，将 1.6 所获得的蛋白序列与 PHI-base（Pathogen-host interaction database, PHI）数据库（病原真菌-寄主相互作用数据库 <http://www.phi-base.org/>）进行比对分析（Winnenburg *et al.*, 2008），通过数据库中经过实验验证和文献支持的致病基因和效应基因，包括侵染宿主（植物、脊椎动物、昆虫、线虫和真菌）的致病病原（真菌、细菌和线虫等）互作相关基因，预测蛋白质在寄主感染过程中的功能，筛选爪哇虫草菌中具有致病功能的蛋白。进一步对与 PHI 数据库中比对所获得的具有致病功能的蛋白序列进行长度筛选，选取小于 300 个氨基酸的蛋白序列，作为爪哇虫草菌的候选效应因子。

1.8 候选效应因子表达模式分析

供试爪哇虫草菌保存于广东省农业科学院植物保护研究所，经致病力测定对红火蚁具有较强致病力（官昭瑛等，2024）。将菌株分别接种于马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基（马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 20 g/L、蒸馏水 1000 mL）和添加产孢抑制剂纳他霉素（色谱纯，上海麦克林生化科技有限公司）的 PDA 培养基。抑制培养基制备方法：按培养基终浓度制备浓度为 3g/L 的抑制剂母液，待培养基冷却至 50°C 左右时，以 1 : 10 的比例（按 18 mL/皿培养基加入 2 mL 抑制剂）倒皿。接种后将爪哇虫草菌置于温度 27°C±1°C，相对湿度 70%±5%，光周期 L : D=12 h : 12 h 的恒温培养箱中培养。为研究产孢抑制前、后处理的 PDA 培养基中爪哇虫草菌在菌丝生长和产孢阶段的基因表达差异，分别收集两种培养基上培养 2 d（菌丝生长阶段）和 14 d（大量产孢阶段）的爪哇虫草菌，采用 Trizol 法提取各样品的总 RNA（Kiefer *et al.*, 2000）。根据候选效应因子的基因序列，采用 NCBI 数据库中的 Premier-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计引物（表 1），以 *efl-beta* 为内参基因（NCBI 编号：EH413796），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成的引物，利用荧光定量 PCR 法（qPCR）检测相关基因的表达，反应体系为 20 μL：

2×PerfectStart® Green qPCR Super Mix 10μL, cDNA 模板 3 μL, 上、下游引物 (10μmol/L) 各 0.5 μL, 无核酸酶水 6 μL。反应条件: 95°C预变性 2 min; 95°C变性 10 s, 56°C退火 15 s, 72°C延伸 20 s, 进行 35 个循环; 72°C终延伸 10 min。采用 2^{-ΔΔCT} 法分析基因的相对表达量 (Livak and Schmittgen, 2001), 实验结果以 PDA 培养基接种后 2 d (菌丝生长阶段) 表达量做归一化处理。每个基因都进行 3 个生物学重复和 3 个技术重复, 使用 SPSS 21 软件进行 T 显著性检验分析。

表 1 qRT-PCR 引物
Table1 qRT-PCR primer

基因 Gene	序列 Sequences (5'- 3')	扩增大小 (bp) Amplicon size
TQW04886	F- CCAAGGGTGACGCTCTTCTT R- GGGGACTTTGGAGACGACAG	146
TQW02068	F-TGCTGCAATGACGAGTCTGT R-GTGCAGCCAAGGTTGACAAG	209
<i>efl-beta</i>	F-TGAAGACCGATAAGGGCATC R-TTCCCCAGTGCCTCAAATAC	112

2 结果与分析

2.1 爪哇虫草菌效应因子全基因组预测

在爪哇虫草菌基因组数据库中下载全基因组序列, 其中含有 11 142 条氨基酸序列, 基因组信息见表 2。

表 2 爪哇虫草菌全基因组信息
Table 2 Genome information of Cordyceps javanica

条目List	装配统计 Assembly statistics
基因组装配大小 (Mb) Genome size	35
基因组的框架序列数 Number of scaffolds	173
基因组的连续序列数 Number of contigs	658
框架序列累加至总长度 1/2 时最后一个框架序列的长度 (Mb) Scaffold N50	1.8
长度总和占基因组大小一半时框架序列的条数 Scaffold L50	7
连续序列累加至总长度的 1/2 时最后一个连续序列的长度 (kb) Contig N50	127.2
长度总和占基因组大小一半时连续序列的条数 Contig L50	84

根据效应因子特征, 使用 SignalPv5.0 对 11 142 个蛋白序列进行分析, 预测得到有 1 063 个编码含 N 端信号肽的蛋白, 占全基因组蛋白序列的 9.54%, 总序列长度有 429 962 aa; 含信号肽的蛋白序列长度小于 300aa 的蛋白数量共有 477 个, 占了全部蛋白数量的 43.28%, 其中序列长度在 150~300aa 的蛋白数量最多, 有 295 个 (图 1)。

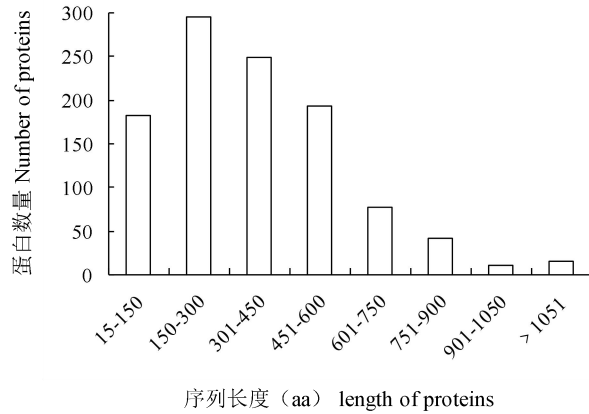


图1 爪哇虫草菌含 N 端信号肽蛋白的序列长度分布

Fig.1 Length distribution of protein sequences with signal peptides in *Cordyceps javanica*

含信号肽的蛋白质序列若含有跨膜区,则该蛋白可能为膜受体,也可能为膜上的锚定蛋白或者离子通道蛋白。因此,进一步利用 TMHMM v.2.0 分析蛋白序列的跨膜结构域,在 1063 个具有信号肽的蛋白中,有 853 个蛋白序列不含跨膜结构域,有 210 个具有跨膜结构域,其中有 71 个蛋白序列含有 2~14 个跨膜螺旋数,有 139 个蛋白序列只含有 1 个跨膜螺旋数。由于只含 1 个跨膜螺旋数的蛋白所具有的跨膜结构域位置均位于 N 端,该区域可能为前期所预测的信号肽序列,而 TMHMM v.2.0 分析不能完全对信号肽序列及所属跨膜域区序列进行区分,因此以不含及含 1 个跨膜螺旋数的 992 个蛋白序列进行下一步分析。

在真核细胞中,分泌蛋白的分泌目标可能在胞内细胞器而非胞外,因而将筛选出的 992 个蛋白序列进一步以 TargetPv2.0 进行分析,排除非胞外分泌蛋白(线粒体、其他定位等)。分析显示含有胞外定位信号、线粒体目标肽所占比例分别为 99%和 1%,最终得到 990 个蛋白定位为分泌途径的信号肽。

以 ProtComp v.9.0 程序对 990 个含有胞外定位信号的蛋白进行定位分析,从而确定属于胞外分泌蛋白类型或分泌到胞内的蛋白类型。经分析有 611 个蛋白分泌至胞外,属于胞外分泌蛋白类型,另有 379 个蛋白质并不分泌到细胞外围。其中,有 11 个转运至细胞核、108 个转运至细胞质膜、24 个转运至细胞质、133 个转运至线粒体、30 个转运至内质网、10 个转运至过氧化物酶体、38 个转运至溶酶体、17 个转运至高尔基体、8 个转运至液泡,其蛋白质所占比例分别为 1.11%、10.91%、2.24%、13.43%、3.03%、1.01%、3.84%、1.72%和 0.81% (图 2)。

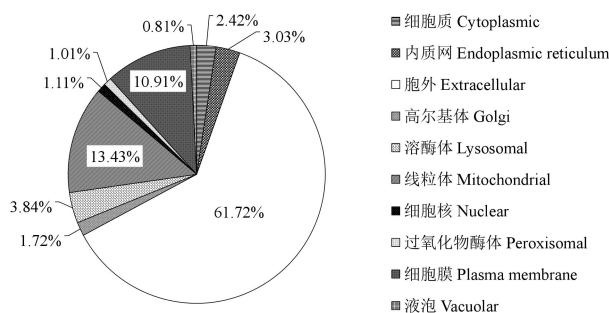


图2 爪哇虫草菌含有胞外定位信号的蛋白亚细胞定位分析

Fig.2 Subcellular localizations of proteins with signal peptides in *Cordyceps javanica*

2.2 爪哇虫草菌分泌组蛋白半胱氨酸含量和多个串联重复序列分析

将 611 个定位于细胞质中的蛋白序列，进行半胱氨酸含量及多串联重复分析，得到 348 个含有高半胱氨酸 (≥ 6) 含量的蛋白。含有半胱氨酸的个数分布从 6~43，其中含 6 个半胱氨酸的蛋白最多，有 94 个（图 3）。基于 T-Reks，将 348 个蛋白序列进一步进行多串联重复分析，得到 117 个具有串联重复单元的蛋白。

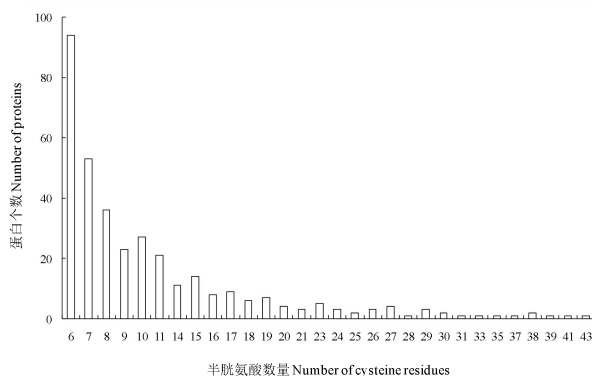


图 3 爪哇虫草菌分泌组的半胱氨酸含量分类

Fig. 3 Number of cysteine residues in the secretome of *Cordyceps javanica*

2.3 爪哇虫草菌候选效应因子功能预测

将富含半胱氨酸且多串联重复性高的 117 个蛋白序列和 PHI 数据库进行比对，有 57 个蛋白在 PHI 数据库中获得注释。在相应基因突变表型上归类数量相对较多的条目有：不影响致病力 (Unaffected pathogenicity) 的蛋白有 18 个，占总数的 31.58%；缺失后会造成毒力减弱 (Reduced virulence) 的蛋白有 26 个，占总数的 45.61%；已被证明是效应因子 (Effectors) 的蛋白有 7 个，占总数的 12.28%（表 3）。

表 3 爪哇虫草菌候选效应因子的基因功能汇总

Table 3 Summary of the gene functions of candidate effectors in *Cordyceps javanica*

缺失后致病力 Mutant pathogenicity	蛋白数量 Number of proteins	占比 (%) Percentage
不影响致病力 Unaffected pathogenicity	18	31.58
毒力减弱 Reduced virulence	26	45.61
混合型 Mixed outcome	4	7.02
毒力增强 Increased virulence	2	3.51
效应因子 Effectors	7	12.28

2.4 致病相关候选效应因子分析

由于效应因子的氨基酸残基数量小于 300 aa，因此将 PHI 数据库中有注释结果的蛋白序列进行长度过滤，最终获得 10 个小分子蛋白，其氨基酸残基数量在 50~300 aa 之间（表 4）。根据注释到的蛋白功能，筛选出 4 个突变表型为毒力减弱的蛋白作为致病相关的候选效应因子，包括 2 个为未知功能的蛋白 (TQW08245、TQW03635)，及细胞壁蛋白 (TQW04886)

和疏水蛋白（TQW02068）各 1 个。

表 4 爪哇虫草菌候选效应因子
Table 4 Putative effectors of *Cordyceps javanica*

蛋白编号 Protein ID	蛋白长度 (AA) Protein length	基因注释 Gene annotation	匹配的物种 Matched species	突变表型 Mutant phenotype
TQW08245	264	疏水蛋白 Hydrophobin	麦角菌 <i>Claviceps purpurea</i>	不影响致病力 Unaffected pathogenicity
TQW05898	168	未知功能 Unknown	禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i>	毒力减弱 Reduced virulence
TQW05969	296	糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白 Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins	禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i>	不影响致病力 Unaffected pathogenicity
TQW05222	171	分泌蛋白 Secreted proteins	稻瘟病菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>	不影响致病力 Unaffected pathogenicity
TQW04886	277	细胞壁蛋白 Cell wall protein	球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	毒力减弱 Reduced virulence
TQW05037	209	含溶解素基序结构域蛋白 LysM domain protein	烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i>	不影响致病力 Unaffected pathogenicity
TQW03635	183	未知功能 Unknown	禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i>	毒力减弱 Reduced virulence
TQW03140	191	效应子 SCP41 Effector SCP41	大丽轮枝菌 <i>Verticillium dahliae</i>	不影响致病力 Unaffected pathogenicity
TQW01995	171	细胞壁蛋白 Cell-wall proteins	烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i>	不影响致病力 Unaffected pathogenicity
TQW02068	110	疏水蛋白 Hydrophobin	球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	毒力减弱 Reduced virulence

2.5 候选效应因子的表达特征分析

利用实时荧光定量 PCR 技术分析了 2 个爪哇虫草菌效应因子 TQW04886 和 TQW02068，在营养生长至生殖生长转变过程中在转录水平上的表达特征（图 4）。两个效应因子在 PDA 培养基和含产孢抑制培养基中，菌丝生长阶段的基因表达水平皆较低；在 PDA 培养基中产孢阶段出现不同程度的上调表达，两个效应因子在该时期的表达量皆达到最高值。TQW04886 在产孢抑制培养基中，由菌丝阶段向产孢阶段转换时表达量下调表达；而 TQW02068 在产孢抑制培养基中两个发育阶段的表达情况无明显变化。

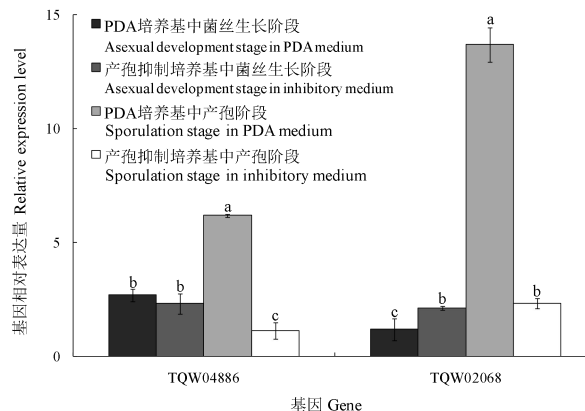


图 4 候选效应因子在不同培养基上各发育阶段的基因表达模式

Fig.4 The gene expression patterns of candidate effectors at different developmental stages on various culture media

注：不同小写字母表示各培养基发育阶段间具有显著性差异， $P < 0.05$ ；相同小写字母表示各培养基发育阶段间不具有显著性差异， $P > 0.05$ 。Note: Different lowercase letters indicated significant differences among developmental stages on different culture media ($P < 0.05$); the same lowercase letters indicated no significant differences among developmental stages on different culture media ($P > 0.05$).

3 结论与讨论

昆虫病原真菌是如何影响寄主昆虫的防御反应，以及它们的效应因子如何在宿主和病原体之间传递信号，这些领域的研究相对较少。效应因子的预测依赖于物种的基因组信息，而高质量的基因组数据是识别候选效应因子的关键。如果基因组数据不足以提供充分的基因信息，或者在预测过程中对基因结构的解读不够精确，可能会导致预测结果出现偏差。本研究利用病原菌与宿主互作的数据库对效应因子进行功能注释。尽管数据库中的致病基因、毒力基因和效应基因已经过实验验证，但它们可能存在物种偏好性，以及某些病原序列可能具有高度同源性问题。对于爪哇虫草菌这类在数据库中缺乏记录的病原菌，缺乏特定物种的参考数据，因此对所获得的具有致病功能的蛋白序列进行特定物种下的实验验证显得尤为重要。

以往关于昆虫病原真菌侵染特性的研究，多集中在菌体自身分泌的一系列蛋白及宿主表皮诱导产生的酶类物质（Beys-da-Silva *et al.*, 2014; Coutinho Rodrigues *et al.*, 2016; Kordi *et al.*, 2018; Perinotto *et al.*, 2014），部分潜在与宿主免疫系统的调节相关的真菌效应因子，涉及侵染系统、改变宿主细胞结构和功能等（Liang *et al.*, 2013; Beysda-Silva *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2016a, 2016b），由于这些研究使用种类各异的昆虫作为模型，在效应因子筛选和鉴定方面所使用的方法存在差异。一方面，在获得候选效应因子后，如何对其基因功能进行研究，依赖于该真菌物种遗传转化体系的建立和完善，能否在真菌内实现基因的过表达或基因沉默，通过真菌毒力变化来评鉴效应因子的功能。另一方面，效应因子不仅可能通过作用于模式识别受体（PRRs）或级联反应来抑制病原相关分子模式触发的免疫反应，还可能直接干扰 PRR 信号通路及其下游防御反应，因此效应因子对信号传导路径的干扰具有复杂性（Block *et al.*, 2008; Boller and He, 2009）。

通过基因组分析和 PHI 数据库信息比对，本研究成功预测并筛选出 4 个可能与爪哇虫草菌致病效果相关的潜在效应因子蛋白，有两个与昆虫病原真菌球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 的细胞壁蛋白（TQW04886）和疏水蛋白（TQW02068）具有同源性，这些蛋白在原物种中敲除后表现出致病能力减弱的突变表型，为本研究后续的功能试验验证缩小范围。由于菌株分生孢子的分化形成与致病力密切相关，而产孢意味着昆虫病原真菌完成了从营养生长向生殖生长的转变，因而本研究对这两个效应因子编码基因在不同培养基上的菌丝和产孢阶段表达情况进行了分析，发现其在菌丝生长阶段转录水平上均呈现不同程度的低表达，在 PDA 培养基中产孢阶段显著上调表达，而在产孢抑制培养基中显著下调表达，进一步证明本研究预测得到的候选效应因子的可靠性，这与效应因子在产孢阶段会大量表达的情况相

符合。疏水蛋白是丝状真菌特异产生的小分子两亲性分泌蛋白，包含约 100 个氨基酸，具有强大的表面活性。分生孢子的疏水性决定了其对昆虫体壁的附着力，而这种附着力是启动正常体壁侵染的关键（Askolin *et al.*, 2005; Quarantin *et al.*, 2019）。在昆虫病原真菌中，蛹虫草 *Cordyceps militaris* 的疏水蛋白由基因 *Cmhyd4* 负调控子实体发育，该基因缺失株的气生菌丝生长更旺盛，菌丝生长速率更快，孢子产量和子实体密度更高（Li *et al.*, 2023）。蝗绿僵菌 *Metarhizium acridum* 疏水蛋白 HYD3 在侵染过程中特异性激活对东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 细胞和体液免疫的应激反应（Jiang *et al.*, 2020），球孢白僵菌疏水蛋白 HYD1 和 HYD2 的双敲菌株孢子表面棒束状结构完全消失，其分生孢子疏水性、附着力和毒力下降，对热胁迫的抵抗力大幅增强（Zhang *et al.*, 2011）。真菌细胞表面相关蛋白是细胞壁的重要组成，在真菌逃避寄主免疫反应中起到关键作用。以球孢白僵菌缺失细胞壁蛋白基因 *BbCwp* 的突变菌株感染寄主，会引起寄主与免疫相关的基因（如 β -1, 3-葡聚糖识别蛋白）表达上调，导致寄主血细胞对其包裹作用增强（Ding *et al.*, 2020）。烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 分生孢子细胞壁蛋白 CcpA 缺失导致宿主对其免疫活性增强，作为影响分生孢子免疫原性的一种结构蛋白，CcpA 是分生孢子表面结构的“隐身衣”，使其被寄主的免疫识别达到最小化（Voltersen *et al.*, 2018）。本研究中两个候选效应子基因的最高表达量存在差异且产孢阶段仅取样了一个时间点，推测它们还有可能在产孢及侵染寄主的不同时期发挥作用，因而进一步验证候选效应蛋白的功能将成为后续必不可少的工作。目前，关于这些蛋白及其潜在功能在爪哇虫草菌中的作用研究非常有限，尚不清楚其他昆虫病原真菌效应因子调控孢子毒力和免疫逃逸的机制是否适用于爪哇虫草菌。鉴于不同真菌物种间致病性进化存在极大差异，有必要进一步通过实验验证这些效应因子在细胞代谢中的重要作用，以便更清晰地理解其代谢机制和致病机理。

参考文献（References）

- Askolin S, Penttilä M, Wösten HA, *et al.* The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes *hfb1* and *hfb2* have diverse functions in fungal development [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 253(2): 281-288.
- Avery PB, Duren EB, Qureshi JA, *et al.* Field efficacy of *Cordyceps javanica*, white oil and spinetoram for the management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* [J]. *Insects*, 2021, 12(9): 824.
- Barash S, Wang W, Shi Y. Human secretory signal peptide description by hidden markov model and generation of a strong artificial signal peptide for secreted protein expression [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 294(4): 835-842.
- Beys-da-Silva WO, Santi L, Berger M, *et al.* Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection [J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13 (5): 2282-2296.
- Block A, Li G, Fu ZQ, *et al.* Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(4): 396-403.
- Boller T, He SY. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens [J]. *Science*, 2009, 324(5928): 742-744.
- Bolton MD, Van Esse HP, Vossen JH, *et al.* The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species [J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(1): 119-136.
- Chen JS, Zheng SQ, Zheng W, *et al.* Prediction for secreted proteins from *Magnapor grisea* genome [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(12): 2474-2482. [陈继圣, 郑士琴, 郑武, 等. 全基因组预测稻瘟菌的分泌蛋白 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(12): 2474-2482]
- Cheng Q, Cao Y, Jiang C, *et al.* Identifying secreted proteins of *Marssonina brunnea* by degenerate PCR [J]. *Proteomics*, 2010, 10(13): 2406-2417.

- Cornell MJ, Alam I, Soanes DM, *et al.* Comparative genome analysis across a kingdom of eukaryotic organisms: specialization and diversification in the fungi [J]. *Genome Research*, 2007, 17(12): 1809-1822.
- Coutinho Rodrigues CJB, Perinotto WMS, Beys da Silva WO, *et al.* Virulence, proteolytic and lipolytic activities of Brazilian *Beauveria bassiana* S.l. isolates (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Rhipicephalus microplus* ticks (Acari:Ixodidae) [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2016, 26 (2): 239-249.
- Ding JL, Hou J, Feng MG, *et al.* Transcriptomic analyses reveal comprehensive responses of insect hemocytes to mycopathogen *Beauveria bassiana*, and fungal virulence-related cell wall protein assists pathogen to evade host cellular defense [J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 1352-1365.
- Dong ZY, Shu YX, Chen XY, *et al.* Prediction and analysis of candidate effectors from genome of *Isaria fumosorosea* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2019, 28(12): 2078-2083. [董章勇, 舒永馨, 陈欣瑜, 等. 玫瑰色棒束孢基因组候选效应因子的预测分析 [J]. 西北农业学报, 2019, 28(12): 2078-2083]
- Emanuelsson O, Brunak S, Von Heijne G, *et al.* Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 953-971.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, *et al.* Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 300(4): 1005-1016.
- Guan ZY, Lei YY, Sun X, *et al.* Transcriptome analysis of *Cordyceps javanica* in response to host insect in saprophytic culture [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2024, 46(3): 690-702. [官昭瑛, 雷妍圆, 孙玺, 等. 腐生培养下爪哇虫草对寄主的转录组响应 [J]. 环境昆虫学报, 2024, 46(3): 690-702]
- Isshiki A, Akimitsu K, Yamamoto M, *et al.* Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(6): 749-757.
- Jiang ZY, Ligoxygakis P, Xia YX. HYD3, a conidial hydrophobin of the fungal entomopathogen *Metarhizium acridum* induces the immunity of its specialist host locust [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165: 1303-1311.
- Jones JD, Dangl JL. The plant immune system [J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 323-329.
- Jorda J, Kajava AV. T-REKS: Identification of Tandem REpeats in sequences with a K-meanS based algorithm [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(20): 2632-2638.
- Kiefer E, Heller W, Ernst D. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 18: 33-39.
- Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, *et al.* Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(4): e1002643.
- Kordi M, Farrokhi N, Masoudi A, *et al.* Expression analyses of some *Beauveria bassiana* genes in response to cuticles of four different insects [J]. *Journal of Crop Protection*, 2018, 4(5): 675-690.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: Application to complete genomes [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305 (3): 567-580.
- Lei YY, Li QC, Fu ZY, *et al.* Analysis of the chemical ecological mechanism by which red imported fire ant *Solenopsis invicta* avoids entomopathogenic fungi [J]. *Journal of Plant Protection*, 2024, 51(4): 935-943. [雷妍圆, 李群臣, 符展源, 等. 红火蚁回避虫生真菌的化学生态学机制分析 [J]. 植物保护学报, 2024, 51(4): 935-943]
- Li X, Liu M, Dong C. Hydrophobin gene *Cmhyd4* negatively regulates fruiting body development in edible fungi *Cordyceps militaris* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5): 4586.
- Li Y. New biopesticides registered in China in 2021 [J]. *World Pesticide*, 2022, 44(2): 1-8. [李洋. 2021 年国内新登记的生物农药品种 [J]. 世界农药, 2022, 44(2): 1-8]
- Liang L, Wu H, Liu Z, *et al.* Proteomic and transcriptional analyses of *Arthrobotrys oligospora* cell wall related proteins reveal complexity of fungal virulence against nematodes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97: 8683-8692.
- Lin R, Zhang X, Xin B, *et al.* Genome sequence of *Isaria javanica* and comparative genome analysis insights into family S53 peptidase evolution in fungal entomopathogens [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103: 7111-7128.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408.
- O'Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, *et al.* Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses [J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(9): 1060-1064.
- Oeser B, Heidrich PM, Muller U, *et al.* Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 36(3): 176-186.
- Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle [J]. *Insects*, 2013, 4(3): 357-374.
- Padliya ND, Cooper B. Mass spectrometry-based proteomics for the detection of plant pathogens [J]. *Proteomics*, 2006, 6(14): 4069-4075.

- Perinotto WMS, Golo PS, Coutinho Rodrigues CJB, *et al.* Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus* [J]. *Veterinary Parasitology*, 2014, 203 (1-2): 189-196.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, *et al.* SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785-786.
- Porquier A, Tisserant C, Salinas F, *et al.* Retrotransposons as pathogenicity factors of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*[J]. *Genome Biology*, 2021, 22: 1-19.
- Quarantin A, Hadelier B, Kröger C, *et al.* Different hydrophobins of *Fusarium graminearum* are involved in hyphal growth, attachment, water-air interface penetration and plant infection [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 751.
- Ramachandran SR, Yin C, Kud J, *et al.* Effectors from wheat rust fungi suppress multiple plant defense responses [J]. *Phytopathology*, 2017, 107(1): 75-83.
- Stergiopoulos I, de Wit PJGM. Fungal effector proteins [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47(1): 233-263.
- ten Have A, Mulder W, Visser J, *et al.* The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(10):1009-1016.
- Tian L, Chen JY, Chen XY, *et al.* Prediction and analysis of *Verticillium dahliae* VdLs.17 Secretome [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(15): 3142-3153. [田李, 陈捷胤, 陈相永, 等. 大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* VdLs.17) 分泌组预测及分析 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(15): 3142-3153]
- Tong SM, Chen Y, Ying SH, *et al.* Three DUF1996 proteins localize in vacuoles and function in fungal responses to multiple stresses and metal ions [J]. *Scientific Reports*, 2016a, 6(1): 20566.
- Tong SM, Chen Y, Zhu J, *et al.* Subcellular localization of five singular WSC domain-containing proteins and their roles in *Beauveria bassiana* responses to stress cues and metal ions [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2016b, 8(2): 295-304.
- Valette-Collet O, Cimerman A, Reignault P, *et al.* Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(4): 360-367.
- Voltersen V, Blango MG, Herrmann S, *et al.* Proteome analysis reveals the conidial surface protein CcpA essential for virulence of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. *mBio*, 2018, 9(5): e01557-18.
- Wang D, Xing PX, Diao HL, *et al.* Pathogenicity characteristics of the entomopathogenic fungus *Cordyceps javanica* IJ-tg19 to *Acyrtosiphon pisum* [J]. *Biocontrol*, 2023, 68(4): 447-458.
- Winnenburg R, Urban M, Beacham A, *et al.* PHI-base update: Additions to the pathogen-host interaction database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 36(suppl_1): 572-576.
- Yakoby N, Freeman S, Dinoor A, *et al.* Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(8): 887-891.
- Yamagishi D, Akamatsu H, Otani H, *et al.* Pathological evaluation of host-specific AAL-toxins and fumonisin mycotoxins produced by *Alternaria* and *Fusarium* species [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2006, 72: 323-327.
- Zhang S, Xia YX, Kim B, *et al.* Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* [J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 80(3): 811-826.
- Zhu Z, Xiong J, Shi H, *et al.* *Magnaporthe oryzae* effector MoSPAB1 directly activates rice *Bsr-d1* expression to facilitate pathogenesis [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 8399.