

## 研究报告

玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)侵染小菜蛾的表达谱分析谢梅琼<sup>1</sup>, 王龙江<sup>3</sup>, 何余容<sup>\*2</sup>, 吕利华<sup>4</sup>, 顾家睿<sup>2</sup>

1 宜春学院生命科学与资源环境学院 江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西 宜春 336000

2 华南农业大学植物保护学院, 广东 广州 510642

3 宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000

4 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东 广州 510640

谢梅琼, 王龙江, 何余容, 吕利华, 顾家睿. 玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)侵染小菜蛾的表达谱分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 975-990

Xie Meiqiong, Wang Longjiang, He Yurong, Lyu Lihua, Gu Jiarui. Transcriptome profiling of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) infected by entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 975-990

**摘要:**【背景】昆虫病原真菌对寄主的侵染是一个十分复杂的过程,是多基因共同作用的结果。玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*) IFCF01 菌株对小菜蛾具有很高的致病力,然而有关玫烟色棒束孢对小菜蛾致病的相关基因少见报道。【目的】筛选玫烟色棒束孢侵染小菜蛾相关基因,为更好地利用玫烟色棒束孢防治小菜蛾提供基因靶点。【方法】采用第二代高通量测序技术 RNA-Seq,对玫烟色棒束孢侵染小菜蛾 2–3 龄幼虫 4、8、12、16、24、30、36 h 的虫菌混合样品(处理组)及纯培养玫烟色棒束孢(对照组)进行测序分析并筛选差异表达基因,结合生物信息学方法分析差异基因涉及的功能模块和信号通路。【结果】玫烟色棒束孢侵染小菜蛾混合样品与纯培养玫烟色棒束孢对照组对比分析共获得 28 384 个差异基因,其中显著差异表达基因 274 个,上调表达 118 个,下调表达 156 个。筛选获得的显著差异表达基因,特别是上调表达基因可能与玫烟色棒束孢对小菜蛾的侵染有关。GO 二级分类显示,差异表达基因能够注释到 36 个 GO 条目中,包含 18 个生物学过程、9 个细胞组分和 9 个分子功能。KEGG 通路分析显示共有 171 个差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)注释到 132 个通路中,其中有 66 个 DEG 显著富集在 14 个通路中。这些显著差异表达基因中大部分为玫烟色棒束孢侵染过程中潜在致病毒力相关基因。【结论】本研究为筛选玫烟色棒束孢侵染小菜蛾致病相关基因提供重要数据库,也为阐明玫烟色棒束孢对小菜蛾的侵染机制提供基础。

**关键词:** 玫烟色棒束孢; 小菜蛾; 侵染相关基因; 转录组

基金项目: 江西省重点研发计划(20202BBFL63009); 江西省教育厅项目(GJJ201620)

Supported by: Key Research and Development Program of Jiangxi Province (20202BBFL63009); Department of Education Project of Jiangxi Province (GJJ201620)

\*Corresponding author: E-mail: yrhe@scau.edu.cn

Received: 2021-08-23; Accepted: 2021-10-28; Published online: 2021-12-13

# Transcriptome profiling of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: *Plutellidae*) infected by entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*

XIE Meiqiong<sup>1</sup>, WANG Longjiang<sup>3</sup>, HE Yurong<sup>\*2</sup>, LYU Lihua<sup>4</sup>, GU Jiarui<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Jiangxi Key Laboratory of Crop Growth Regulation, College of Life Sciences and Resources and Environment, Yichun University, Yichun 336000, Jiangxi, China

<sup>2</sup> College of Plant Protection, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

<sup>3</sup> College of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Yichun 336000, Jiangxi, China

<sup>4</sup> Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

**Abstract:** [Background] The infection of entomopathogenic fungi is a complex process resulted from the joint action of multiple genes. The *Isaria fumosorosea* isolate IFCF01 has high pathogenicity to *Plutella xylostella*. However, there are few reports on the genes related to the pathogenicity of *I. fumosorosea* to *P. xylostella*. [Objective] This study aims to explore the genes related to the infection of *I. fumosorosea* to *P. xylostella*, so as to reveal the pathogenic mechanism of *I. fumosorosea* and provide reference for the application of *I. fumosorosea* in the control of *P. xylostella*. [Methods] We performed high-throughput RNA sequencing to compare the transcriptomes of *I. fumosorosea* pure culture (control group) and the mixed samples of 2nd–3rd instar larvae of *P. xylostella* infected by *I. fumosorosea* for 4, 8, 12, 16, 24, 30, and 36 h (treatment group) and mined the differentially expressed genes (DEGs) between the two groups. The functional modules and signaling pathways involving the DEGs were analyzed by bioinformatics method. [Results] A total of 28 384 DEGs were screened out, including 274 significant DEGs (118 up-regulated and 156 down-regulated ones). The significant DEGs screened out in this study, especially the up-regulated ones, were related to the infection. We conducted GO annotation to analyze the DEGs and found 36 GO terms, which included 18 biological processes, 9 cellular components, and 9 molecular functions. There were 171 DEGs enriched in 132 KEGG pathways, of which 66 DEGs were significantly enriched in 14 pathways. Further analysis showed that many DEGs were virulence-associated genes during the infection. [Conclusion] The findings generated from this study provide a bioinformatic database for screening the pathogenic genes related to the infection of *I. fumosorosea* in *P. xylostella* and lays a theoretical foundation for elucidating the mechanism of *I. fumosorosea* infecting *P. xylostella*.

**Keywords:** *Isaria fumosorosea*; *Plutella xylostella*; infection-related genes; transcriptome

小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 属鳞翅目 (Lepidoptera) 菜蛾科 (*Plutellidae*), 主要危害卷心菜、花椰菜、油菜籽等十字花科蔬菜, 对作物的整个生长期均可造成危害, 被认为是世界上十字花科蔬菜最具毁灭性的害虫<sup>[1-2]</sup>。截至目前, 人们花费了很大力气对小菜蛾进行综合治理,

然而现阶段对其防治还是以化学防治为主<sup>[3]</sup>。据报道, 小菜蛾已经对几乎所有田间使用的杀虫剂产生了抗性, 包括苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 内毒素<sup>[4]</sup>。化学农药的不适当及大量使用, 不仅杀死了小菜蛾的自然天敌, 造成环境的污染, 最终还导致了害虫抗药性选择性

压力上升。抗药性的产生及随之带来的环境污染问题使得国内外越来越多的学者开始寻求更有效的生物防治方法。

虫生真菌作为一类重要的微生物杀虫剂,已被广泛应用于农林害虫的防治。玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)作为一类常见的昆虫病原真菌,其寄主范围广,已记载的有 46 个科的昆虫,包括小菜蛾、烟粉虱(*Bemisia tabaci* Gennadius)和麦双尾蚜(*Diuraphis noxia* Mordvilko)等一些重要农业害虫。随着国内外学者对其生物学、生化及应用方面研究的不断增多<sup>[5-9]</sup>,利用该菌来防治小菜蛾越来越受到人们的重视。黄宇利用 DNA 步移方法扩增了玫烟色棒束孢 *Ifcdp1* 基因的 DNA 和 cDNA 全长,并利用基因敲除方法研究了该基因的功能,通过研究 *Ifcdp1* 基因敲除株和野生型菌株对小菜蛾的致病力发现,*Ifcdp1* 基因敲除株对小菜蛾的致病力增强<sup>[10]</sup>。对玫烟色棒束孢 Pr1 酶与毒力的关系及对小菜蛾幼虫血细胞凋亡影响的研究发现,Pr1 酶活力与菌株致病力成正相关,Pr1 蛋白酶基因表达量与 Pr1 酶活之间成正比;同时发现小菜蛾 3、4 龄幼虫经玫烟色棒束孢菌株 904 处理后,各龄期幼虫的血细胞均出现了不同程度的细胞凋亡<sup>[11]</sup>。么瑞娜则利用酵母双杂交技术构建了由小菜蛾诱导的玫烟色棒束孢酵母双杂交 cDNA 文库,以小菜蛾 *serpin* 基因编码的蛋白为诱饵,从 cDNA 文库中获得与 Serpin 蛋白相互作用蛋白的编码序列,为后续玫烟色棒束孢与小菜蛾的互作研究奠定了基础<sup>[8]</sup>。然而昆虫病原菌的致病机理是一个十分复杂的过程,是受多基因控制的结果。近年来,随着高通量测序技术的发展,越来越多昆虫病原真菌的致病相关基因被挖掘。采用新一代 Solexa 高通量测序技术对纯培养的球孢白僵菌及球孢白僵菌侵染小菜蛾 48 h 的虫菌混合样品分别进行

转录组测序,经分析共获得显著差异表达基因 716 个,进一步深入分析获得了多个球孢白僵菌侵染过程中与毒力相关的基因<sup>[12]</sup>。Wang 等采用家蚕(*Bombyx mori*)表皮提取液对分离于家蚕的球孢白僵菌进行培养,并利用 RNA 测序技术对家蚕早期基因表达进行分析,共鉴定到 2 108 个上调表达基因和 1 115 个下调表达基因;进一步分析发现大部分差异基因参与代谢过程、催化活性及次级代谢产物的生物合成,也有一部分参与了营养吸收、宿主的防御和黏附<sup>[13]</sup>。诱导蝗绿僵菌 24 h 后发现,在附着胞形成和生长期,大量与翻译和翻译后修饰相关的基因高水平表达,另有 8 个与细胞壁合成通路相关的重要基因高水平表达,同时发现大量与脂类代谢相关基因表达水平明显提高<sup>[14]</sup>。

截至目前,关于玫烟色棒束孢与小菜蛾的互作研究,更多的是关于小菜蛾免疫应答相关机理方面的研究,而关于玫烟色棒束孢对小菜蛾致病关键基因及其调控网络的研究少见报道。本研究的玫烟色棒束孢菌株对小菜蛾具有很强的致病力,其对小菜蛾 2 龄幼虫的致死  $LT_{50}$  仅为 1.66 d,致死终浓度  $LC_{50}$  为  $1.17 \times 10^4$  孢子/mL,致死速度之快至今国内外罕见报道<sup>[15]</sup>。基于此,本研究利用 RNA-Seq 技术对纯培养玫烟色棒束孢菌株及侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢混合样品进行表达谱测序和差异表达基因分析,寻找玫烟色棒束孢致病相关基因,以期为更好地利用该菌防治害虫提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及昆虫

玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)野生型菌株 IFCF01 最初分离于自然染菌的家白蚁(*Coptotermes formosanus*)虫体<sup>[15]</sup>,菌种保存于华南农业大学植物保护学院生物防治研究室

-80 °C 冰箱。菌株于铺有玻璃纸的 PDA 平板上培养, 置于(25±1) °C, 相对湿度≥90%, 光:暗周期 L:D 为 14 h:10 h 条件下培养 10 d 后, 用 0.05%吐温-80 无菌水洗下孢子, 并用磁力搅拌器搅拌约 10 min 后, 经三层灭菌的纱布过滤以除去菌丝, 获得孢子悬浮液, 并用血球计数板计数调整至所需的孢子浓度。

小菜蛾采集自广州岑村菜地甘蓝苗上, 在室内于温度(25±1) °C、相对湿度(60%±5%)及 L:D 为 14 h:10 h 条件下, 用甘蓝苗继代饲养 5 代以上, 选取个体大小、活力基本一致的 2-3 龄幼虫进行试验。

## 1.2 表达谱测序样品的制备

以浓度为  $1 \times 10^8$  个孢子/mL 的孢子悬浮液作为供试菌液对小菜蛾进行处理。采用浸虫法, 将 2-3 龄小菜蛾幼虫挑入上述浓度的孢子悬浮液 10 s 后, 将幼虫置于灭菌的滤纸上除去多余的水分, 然后将小菜蛾置于新鲜的甘蓝叶片上, 一并放入铺有湿滤纸(直径为 18 cm)的玻璃培养皿中, 培养皿用保鲜膜封口以保湿, 封口的保鲜膜用针扎孔保持通风透气。接种后将幼虫放置于(25±1) °C、光周期 L:D 为 14 h:10 h 的人工智能培养箱中饲养。每重复 25 头小菜蛾幼虫, 每处理 4 个重复。分别收集菌处理小菜蛾后 4、8、12、16、24、30、36 h 的样品, 经液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱中。每个样品收集 12 头幼虫。分别提取上述 7 个样品的 RNA, 然后将各个样品 RNA 等量混合, 合并为一个含不同染菌时间点的小菜蛾总 RNA 样品(处理组), 用于表达谱文库的构建。以纯培养玫烟色棒束孢 IFCF01 菌株为对照(对照组)。本试验取样时间的选择是根据雷妍圆等关于玫烟色棒束孢对小菜蛾侵染过程的透射电镜观察基础上进行的<sup>[16]</sup>。

## 1.3 总 RNA 提取、cDNA 文库构建及测序

采用 TRIzol 法试剂抽提样品总 RNA。用

Agilent 2100 生物分析仪检测总 RNA 的 RIN 值及 28S:18S。利用 oligo(dT)磁珠分离出 mRNA 并用缓冲液洗脱, 然后通过 Fragmentation buffer 对获得的 mRNA 进行段化处理, 向段化后的 mRNA 加入六碱基随机引物(random hexamers primer)合成 cDNA 第一链, 加入 DNA polymerase I、RNase H 和缓冲液合成 cDNA 第二链, 用 QiaQuick PCR 试剂盒对 cDNA 双链进行纯化, 纯化后的 cDNA 双链黏性末端加 A 并在连接酶作用下连接测序接头; 连接产物经琼脂糖凝胶电泳后用试剂盒进行纯化回收, 配制 PCR 反应体系扩增连接产物, 完成文库构建。合成的 cDNA 样品送往深圳华大基因公司测序, 采用 Illumina HiSeq 2000 系统进行测序, 每个样品 1 个 Line 的测序量。

## 1.4 原始数据处理

对原始数据进行去除接头序列、含 N 序列及低质量 read 后, 获得可用于后续数据分析的 clean data, 最后将 2 个测序样本中的 clean read 与小菜蛾基因组数据(<http://gigadb.org/dataset/100078>)进行比对, 避免样品中含有小菜蛾基因序列, 获得玫烟色棒束孢纯的 UniGene 序列。

## 1.5 UniGene 与参考序列比对

将处理组获得的 clean read 与玫烟色棒束孢转录组数据(该数据保存于 NCBI 数据库中, 检索号为 SRR13236723)及小菜蛾基因组数据(<http://gigadb.org/dataset/100078>)进行比对(避免样品中含有小菜蛾基因序列, 获得玫烟色棒束孢与小菜蛾互作期玫烟色棒束孢纯的表达谱信息), 产生注释。对照组获得的 clean read 与玫烟色棒束孢转录组数据比对, 产生注释。最后统计 clean read 比对到参考基因(玫烟色棒束孢转录组)上的比例。

## 1.6 基因表达量及显著差异表达基因筛选

分别计算对照组(纯培养玫烟色棒束孢菌

株)和处理组(侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢)这2个样品中基因的表达式,并对样本间的基因表达情况进行差异分析。采用 RPKM 法(reads per kilobase transcriptome per million mapped reads)计算基因表达式<sup>[17]</sup>,计算公式如下:

$$\text{RPKM} = \frac{10^6 C}{NL / 10^3}$$

假设目标基因 A 的表达式为: RPKM(A), C 为唯一比对到基因 A 的 clean read 数, N 为唯一比对到参考基因的总 clean read 数, L 为基因 A 的总碱基数目。采用 edgeR 进行差异分析<sup>[18]</sup>,对差异检验的 P 值做多重检验校正, P 值的阈值通过控制 false discovery rate (FDR)来决定, FDR 值越小,则差异倍数越大,表明差异越显著。以  $\text{FDR} \leq 0.001$  且差异倍数不低于 2 倍 ( $\text{Log}_2 \text{ratio} \geq 1$ ) 的标准进行显著差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)的筛选。

### 1.7 GO 和 KEGG 富集分析

将显著差异表达基因比对到 GO 和 KEGG 数据库。使用 Blast2GO 对所有显著差异表达基因进行 GO 功能注释,使用 WEGO 软件<sup>[19]</sup>对显著差异表达基因在生物学过程、分子功能及细胞组分 3 个方面的功能和作用方式进行 GO 分类;并用 KEGG 数据库对基因涉及的通路进行预测,取  $Q \text{ value} \leq 0.05$  的通路为差异表达基因显著富集的通路,以此来判断差异表达基因参与的主要生化代谢通路和信号转导途径。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序结果分析

从纯培养和侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢菌株分别获得 11 906 434 个和 12 599 166 个 raw read (图 1)。去除含有接头的、含 N 及低质量的 read 后,分别得到 11 631 931 个 clean read 和 12 346 987 个 clean read,分别占各样品总 clean

read 的 97.69%和 98.00%,测序质量较高,达到信息分析要求。

将 2 个测序样本中的 clean read 与小菜蛾基因组数据(<http://gigadb.org/dataset/100078>)进行比对,去除样品中可能含有的小菜蛾带来的物种序列污染,分别获得纯培养和侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢非冗余的 clean read,接着使用比对软件 SOAP2<sup>[20]</sup>将处理组和对照组的 clean read 分别比对到玫烟色棒束孢转录组数据(NCBI 检索号为 SRR13236723),纯培养玫烟色棒束孢有 10 763 155 条比对上参考基因,占 clean read 数的 92.53%,其中有 80.28%的 clean read (9 337 635 条)能够完美地比对,有 71.62%的 clean read (8 330 969 条)唯一比对上参考基因;侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢样品有 44 653 条 clean read 比对上参考基因,占 0.36% clean read 数,有 20 830 条 clean read 能够完美地比对,占 0.17%,唯一比对上参考基因的有 39 042 条,占所有 clean read 的 0.32% (表 1)。在所有匹配的序列中,有 99.58%的真菌序列来源于纯培养的玫烟色棒束孢菌株,0.42%的真菌序列来源于侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢混合样品。该结果也说明了玫烟色棒束孢侵染小菜蛾 36 h 以内的各个时间点,其尚处于侵染早期阶段,因此菌丝孢子生物量在混合样品中所占比例非常少。

### 2.2 测序质量及基因覆盖度分析

将对照组和处理组测序获得的 raw read 进行数据处理,在纯培养和侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢样品中只含接头的序列分别为 66 169 条(0.56%)和 64 196 条(0.51%);含 N 的序列均为 3 194 条(0.03%);质量低的序列分别为 205 140 条(1.72%)和 184 658 条(1.47%);对照组和处理组中分别有 97.69%和 97.99%的数据可用于后续分析(图 1)。

表 1 纯培养和侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢的 RNA-Seq 测序结果

Table 1 RNA-Seq sequencing metrics from transcriptomes of pure culture of *Isaria fumosorosea* and the mixture sample of *Plutella xylostella* infected by *I. fumosorosea*

度量标准 Metric	对照组 The control group	处理组 The treatment group
Reads 总数 Total reads	11 631 931	12 346 987
碱基对总数 Total base pairs	569 964 619	60 5002 363
符合设定条件的 Reads 总数 Total mapped reads	10 763 155 (92.53%)	44 653 (0.36%)
完美匹配 Perfect match	9 337 635 (80.28%)	20 830 (0.17%)
唯一匹配 Unique match	8 330 969 (71.62%)	39 042 (0.32%)

注：对照组：纯培养的玫烟色棒束孢；处理组：玫烟色棒束孢侵染小菜蛾的混合样品

Note: The control group: pure culture of *I. fumosorosea*; The treatment group: the mixture sample of *Plutella xylostella* infected by *I. fumosorosea* (the same as follow).

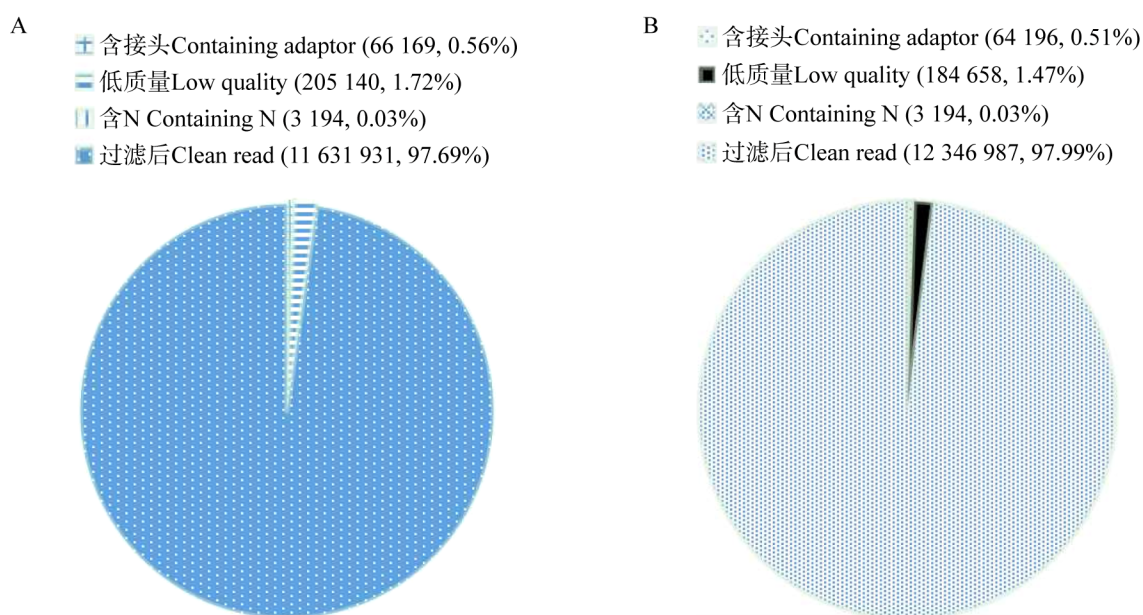


图 1 纯培养玫烟色棒束孢(A)和侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢(B)的测序质量评估图

Figure 1 Classification of raw read of pure culture *Isaria fumosorosea* (A) and the mixture sample of *Plutella xylostella* infected by *I. fumosorosea* (B).

基因测序覆盖度是指每个基因被 read 覆盖的百分比,其值等于基因中 unique mapping read 覆盖的碱基数与基因所有碱基数的比值。在对照组样品中,基因覆盖度在 90%–100%之间的 read 最多,为 9 796 条,约占 35%;其次在 80%–90%之间,为 3 024 条,约占 11%;基因覆盖度在 0%–10%之间的 read 数为 2 643 条,占 9%。在处理组中,基因覆盖度在 0%–10%的 read 最多,为 3 339 条,占 64%,而覆盖度在

90%–100%之间的 read 最少,只有 6 条,占 0.1%。该结果也说明了处理组中真菌生物量占很少比例,该样品中尚有很多序列区域未通过测序获得(图 2)。

### 2.3 显著差异表达基因的筛选

根据转录组分析共得到 28 384 个表达差异基因,其中显著差异表达有 274 个( $FDR \leq 0.001$  和  $\log_2 \text{ratio} \geq 1$ ),上调表达基因 118 个,下调表达基因 156 个(图 3)。



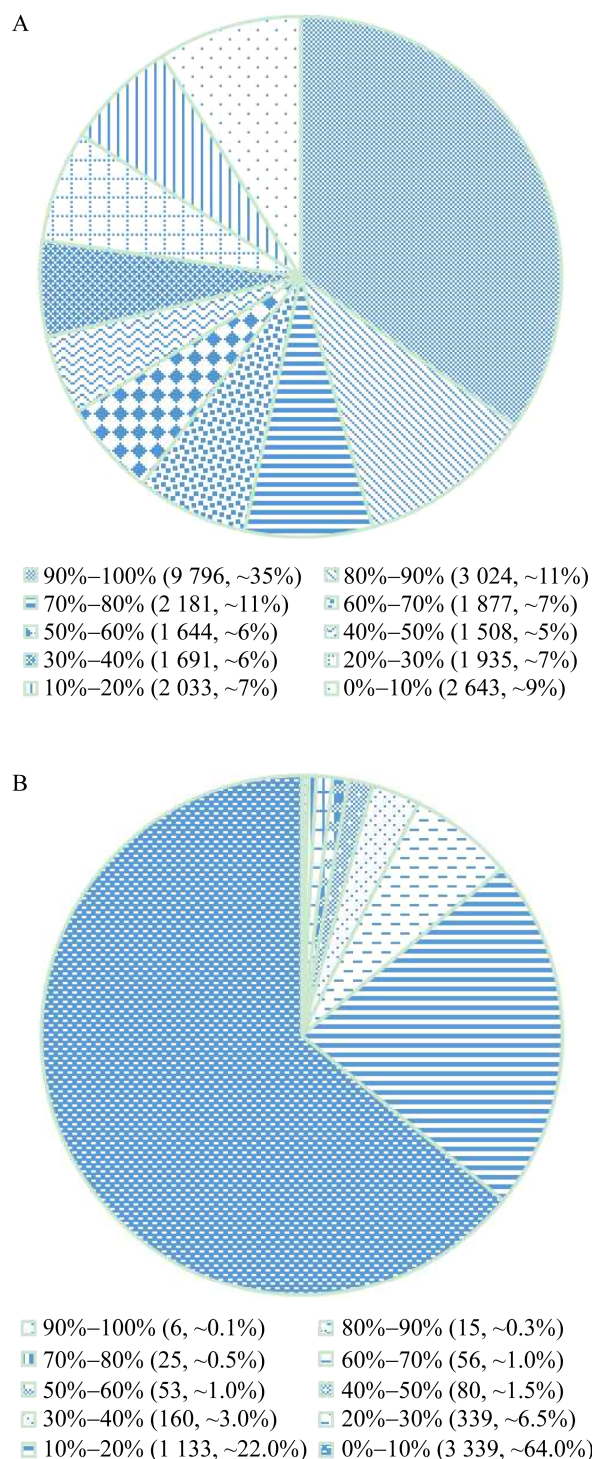


图2 纯培养玫烟色棒束孢(A)及其感染小菜蛾混合样本(B)的基因覆盖度统计

Figure 2 Distribution of gene coverage of pure culture *Isaria fumosorosea* (A) and the mixture sample of *Plutella xylostella* infected by *I. fumosorosea* (B).

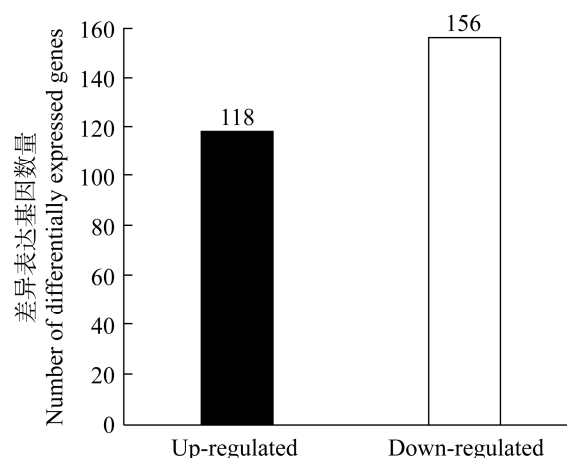


图3 纯培养和感染小菜蛾的玫烟色棒束孢转录组中的差异表达基因数量

Figure 3 Number of differentially expressed genes between transcriptome of pure culture *Isaria fumosorosea* and the mixture sample of *Plutella xylostella* infected by *Isaria fumosorosea*.

## 2.4 差异表达基因的 GO 功能显著性富集分析

对差异表达基因进行 GO 功能注释分析。结果表明, DEG 分布于 36 个 GO 条目中, 包括 9 个细胞组分、9 个分子功能和 17 个生物学过程。DEG 功能主要集中在生物学过程本体的细胞过程 (cellular process)、单一生物过程 (single-organism process)、代谢过程 (metabolic process)、生物过程调节 (regulation of biological process), 细胞组分本体的细胞 (cell) 及细胞部件 (cell part)、膜 (membrane)、膜部件 (membrane part), 以及分子功能本体的催化活性 (catalytic activity) 和结合 (binding) 等 GO term 下。DEG 在细胞过程、代谢过程、结合和催化活性分别有 57、70、57 和 58 个基因, 表明玫烟色棒束孢通过调节各种途径来破坏寄主昆虫的免疫系统 (表 2)。

## 2.5 差异表达基因的通路显著性富集分析

将玫烟色棒束孢感染小菜蛾显著差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析。结果表明, 一共有 171 个 DEG 注释到 132 个通路中, 其中

表 2 纯培养和侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢转录组中差异表达基因 GO 二级分类

Table 2 GO secondary classification of differentially expressed genes between pure culture of *Isaria fumosorosea* and the mixture sample of *Plutella xylostella* infected by *I. fumosorosea*

GO 条目 GO term	差异表达基因数量 Number of DEG
生物学过程 Biological process	
生物调节 Biological regulation	15
细胞组成、组织或生物发生 Cellular component organization or biogenesis	11
细胞过程 Cellular process	57
发展历程 Developmental process	17
建立本地化 Establishment of localization	20
本土化 Localization	20
代谢过程 Metabolic process	70
多生物体过程 Multi-organism process	3
多细胞生物突 Multicellular organismal process	13
生物过程负调节 Negative regulation of biological process	2
生物过程正调节 Positive regulation of biological process	1
生物过程调节 Regulation of biological process	15
生殖 Reproduction	4
生殖过程 Reproductive process	4
对刺激反应 Response to stimulus	11
信号传递 Signaling	3
单-生物过程 Single-organism process	38
细胞组分 Cellular component	
细胞 Cell	31
细胞部件 Cell part	31
细胞外区 Extracellular region	1
高分子复合物 Macromolecular complex	15
膜 Membrane	22
膜部件 Membrane part	17
膜的封闭腔 Membrane-enclosed lumen	3
细胞器 Organelle	22
细胞器部分 Organelle part	13
分子功能 Molecular function	
抗氧化活性 Antioxidant activity	2
结合 Binding	57
催化活性 Catalytic activity	58
酶调节活性 Enzyme regulator activity	1
活动分子传感器 Molecular transducer activity	1
核酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity	1
受体活性 Receptor activity	1
结构分子活性 Structural molecule activity	8
转运活性 Transporter activity	8



有 66 个 DEG 显著富集在 14 个通路中( $Q \leq 0.05$ )。进一步分析表明, 这些显著性富集通路主要包括淀粉和蔗糖代谢(starch and sucrose metabolism)、氨基糖和核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、附着(focal adhesion)、结合(tight junction)、吞噬体(phagosome)和致病性大肠杆菌感染(pathogenic *Escherichia coli* infection)等, 它们含有的显著差异表达基因数在 5–45 个之间。玫烟色棒束孢在侵染过程中, 差异表达基因主要富集在淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢及致病性大肠杆菌感染这 3 个通路中。此外, 这 3 个通路中下调表达基因多于上调表达基因, 注释到淀粉和蔗糖代谢途径的 45 个差异基因中有 34 个显著下调; 注释到氨基糖和核苷酸糖代谢途径的 19 个差异基因中有 13 个显著下调; 而注释到致病性大肠杆菌感染通路的 10 个差异基因

中有 8 个下调。其余的代谢通路上调基因数目多于下调基因数目(表 3)。

## 2.6 差异表达基因中与侵染相关的基因分析

在侵染相关差异表达基因中, 钙调蛋白、V 类几丁质酶、丝氨酸蛋白酶、细胞表面蛋白、肽酶、蔗糖转运蛋白、疏水蛋白 2 等存在最明显的差异表达, 表达量差异倍数均  $>5$  倍, 其中钙调蛋白的表达差异倍数最大, 达 15.3 倍; 细胞膜外蛋白、锌依赖水解酶、细胞外富含丝氨酸苏氨酸的蛋白质、丝氨酸蛋白酶、亲环素 A、磷脂酰肌醇转移蛋白 CSR1、亲环素 B、III 类几丁质酶、GPI 锚定富含丝氨酸的蛋白质等次之, 表达差异倍数在 2–5 倍之间; 蓖麻毒素 B-related 凝集素和疏水蛋白也存在差异表达, 只是表达量差异倍数较低(表 4)。综上所述, 说明这些基因可能与玫烟色棒束孢对小菜蛾的侵染毒力相关。

表 3 纯培养和侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢转录组中差异表达基因显著富集的 KEGG 通路( $Q \leq 0.05$ )

Table 3 Significantly enriched KEGG pathway ( $Q \leq 0.05$ ) of differentially expressed genes in the transcriptomes of pure culture, *Isaria fumosorosea* and the mixture samples of *Plutella xylostella* infected by *I. fumosorosea*

序号 No.	KEGG 通路 KEGG pathway	上调基因 Up-regulated DEG	下调基因 Down-regulated DEG	$Q$ 值 $Q$ -value	通路 ID Pathway ID
1	Starch and sucrose metabolism	11	34	1.18E-05	ko00500
2	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	5	0	1.18E-05	ko05412
3	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	5	0	1.18E-05	ko05410
4	Phototransduction-fly	5	0	4.50E-05	ko04745
5	Dilated cardiomyopathy	5	0	4.50E-05	ko05414
6	Influenza A	7	2	1.05E-04	ko05164
7	Leukocyte transendothelial migration	5	0	1.36E-03	ko04670
8	Focal adhesion	5	0	2.15E-03	ko04510
9	Tight junction	7	0	2.15E-03	ko04530
10	Vibrio cholerae infection	5	0	8.42E-03	ko05110
11	Viral myocarditis	7	0	8.42E-03	ko05416
12	Phagosome	7	0	8.49E-03	ko04145
13	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	6	13	4.94E-02	ko00520
14	Pathogenic <i>Escherichia coli</i> infection	2	8	4.94E-02	ko05130

表 4 纯培养和侵染小菜蛾的玫烟色棒束孢转录组中部分与侵染及毒力相关的差异表达基因

Table 4 Genes associated with infection and virulence in DEGs of pure culture of *Isaria fumosorosea* and the mixture sample of *Plutella xylostella* infected by *I. fumosorosea*

序号 No.	基因 Genes	表达量差异倍数 Log <sub>2</sub> ratio (tre-group/con-group)	上下调控 Up-down- regulation	P 值 P-value	FDR
1	钙调蛋白 Calmodulin	15.288 469 7	Up	4.42E-12	1.09E-09
2	V 类几丁质酶 Class V chitinase	8.737 313 5	Up	9.20E-11	2.04E-08
3	丝氨酸蛋白酶 Serine protease	6.567 388 5	Up	8.54E-09	1.56E-06
4	细胞表面蛋白 Cell surface protein	6.251 886 7	Up	7.55E-10	1.52E-07
5	肽酶 S8 Peptidase S8	5.544 668 5	Up	3.02E-11	7.20E-09
6	蔗糖转运蛋白 Sucrose transporter	5.378 232 4	Up	1.23E-29	6.35E-27
7	疏水蛋白 2 Hydrophobin 2	5.256 186 9	Up	5.48E-30	2.94E-27
8	细胞膜外蛋白 Extracellular membrane protein	4.527 860 2	Up	3.25E-06	3.83E-04
9	锌依赖水解酶 Zn-dependent hydrolase	4.213 751 6	Up	8.68E-06	9.05E-04
10	胞外丝氨酸苏氨酸富集蛋白 Extracellular serine-threonine rich protein	3.627 395 8	Up	4.50E-23	1.88E-20
11	丝氨酸蛋白酶 Serine protease	3.006 920 6	Up	6.31E-08	9.90E-06
12	亲环素 A Cyclophilin A	2.965 463 5	Up	3.89E-63	2.76E-60
13	磷脂酰肌醇转移蛋白 CSR1 Phosphatidylinositol transfer protein CSR1	2.627 047 7	Up	2.24E-12	5.62E-10
14	亲环素 B Cyclophilin B	2.381 438 1	Up	3.49E-25	1.62E-22
15	III 类几丁质酶 ChiA1 Class III chitinase ChiA1	2.124 708 3	Up	3.41E-06	3.95E-04
16	GPI 锚定富含丝氨酸的蛋白质 GPI anchored serine-rich protein	2.075 475 1	Up	1.04E-36	6.05E-34
17	蓖麻毒素 B 凝集素 Ricin B-related lectin	1.831 689 0	Up	2.06E-06	2.52E-04
18	疏水蛋白 Hydrophobin	1.624 874 0	Up	3.92E-08	6.33E-06
19	WSC 结构域蛋白 WSC domain-containing protein	3.152 351 0	UP	2.18E-08	3.67E-06
20	WSC 结构域蛋白 WSC domain-containing protein	-2.190 329 8	Down	5.48E-11	1.27E-08
21	WSC 结构域蛋白 WSC domain-containing protein	-2.171 579 4	Down	2.60E-06	3.12E-04
22	己糖激酶 1 Hexokinase-1	-13.409 887 62	Down	8.52E-06	8.92E-04

### 3 讨论与结论

本研究中玫烟色棒束孢 IFCF01 对小菜蛾的致病力速度之快至今罕见报道。当用菌液浓度为  $1 \times 10^8$  个孢子/mL 处理小菜蛾时, 通过透视镜观察, 发现接种后 4 h 分生孢子已经附着于体表, 接种后 8–16 h 时菌丝穿透表皮, 至 24 h 时菌体在血腔内增殖, 至 36 h 时寄主的器官和组织趋于解体。体内大量繁殖产生的

菌丝开始向体外生长<sup>[16]</sup>。上述研究表明, 玫烟色棒束孢 IFCF01 从侵染至寄主死亡的时间比较短, 在这一过程中菌丝在整个侵染虫体中所占生物量极少。考虑到玫烟色棒束孢的侵染机制在不同时间点的转换和致病相关基因的表达特征, 本研究在获得玫烟色棒束孢转录组数据基础上, 利用 RNA-Seq 技术测定玫烟色棒束孢侵染小菜蛾不同阶段混合样品的表达谱, 并与纯培养的玫烟色棒束孢表达谱进行比对, 筛选

与玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中相关差异表达基因。

通过对照组和处理组差异表达基因分析, 共获得 28 384 个差异表达基因, 表明真菌侵染寄主过程中需要调控大量基因的表达来完成; 进一步对差异表达基因进行显著性差异分析, 共获得 274 个显著差异表达基因, 其中上调表达基因 118 个, 下调表达基因 156 个。为进一步分析这些显著差异表达基因的功能, 使用 WEGO 软件对显著差异表达基因进行 GO 功能分类, 274 个基因分为 36 个不同功能组, 属于 3 个 GO 域(生物学过程、细胞组分、分子功能)。深入分析发现, 基因主要富集到细胞过程、代谢过程、结合和催化活性这几个 GO 条目下, 分别有 57、70、57 和 58 个基因。同时采用 KEGG 分析方法对 DEG 进行功能通路分析, 发现有 171 个 DEG 分布在 132 个通路中, 含有 14 个显著富集通路( $Q \leq 0.05$ ), 其中淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢这 2 个途径包含的差异基因最多, 分别为 45 个和 19 个差异基因。已有研究表明, 这 2 条代谢途径是真菌生长不可或缺的能量来源途径<sup>[21]</sup>, 提示这可能是玫烟色棒束孢在侵染寄主过程中为快速吸收能量物质而采取的一种策略。

本研究发现, 在玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中钙调蛋白(calmodulin, CaM)基因显著上调表达。CaM 作为真核生物中重要的  $\text{Ca}^{2+}$  信使, 参与细胞内多种  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的生理过程, 包括信号传导、生长发育、次生代谢及细胞周期调控等<sup>[22-23]</sup>。研究发现, 球孢白僵菌中的白僵菌素合成酶 BbBEAS 在  $\text{Ca}^{2+}$  作用下与 CaM 形成稳定的复合物, 白僵菌素合成酶还可通过与 CaM 直接相互作用, 在 CaM 介导的信号转导和白僵菌素的生物合成中发挥作用, 推测 CaM 与 BbBEAS 结合可能诱导相互作用蛋白的构象变

化, 从而影响球孢白僵菌的酶活性<sup>[23]</sup>。在真核生物中, CaM 在调节细胞对环境变化的反应中具有重要作用<sup>[24-26]</sup>。研究表明, 在各种胁迫刺激包括热、盐和  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用下, CaM 均抑制了球孢白僵菌蛋氨酸合成酶 BbMetE 的活性<sup>[27]</sup>。研究发现, 对白色念珠菌 CaM 基因 F92+或 F89+1F41+定点突变后抑制了重组菌株形态的正常发生和 DNA 合成, 推断白色念珠菌 CaM 的 C 端球状结构中的 3 个苯丙氨酸尤其是第 92 位苯丙氨酸在白色念珠菌的致病性中具有重要作用<sup>[28]</sup>。刘锐等通过构建灵芝 CaM 沉默转化子来研究 CaM 基因在灵芝生长发育及次生代谢过程中的功能, 结果表明, 沉默 CaM 基因后菌丝生长速率与野生型菌株(WT)相比降低 40%, 灵芝酸含量降低约 34%, 说明 CaM 在灵芝生长及次生代谢过程中具有重要作用<sup>[29]</sup>。本研究中 CaM 基因在玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中表达量显著增加, CaM 基因在玫烟色棒束孢致病过程中的作用是否与其和真菌的某些合成酶相互作用有关, 或与真菌侵染小菜蛾的代谢调控、细胞增殖及信号传导等过程有关, 具体原因有待进一步研究。

KEGG 分析结果还发现, 真菌侵染小菜蛾的显著差异表达基因中包含了与真菌毒力相关的基因。如几丁质酶基因, 几丁质酶已被证明在虫生真菌侵染寄主体表过程中发挥重要作用<sup>[30-31]</sup>。李茂业测定分析了虫生真菌菌株对褐飞虱成虫毒力及其几丁质酶活性的关系, 结果表明菌株毒力与其几丁质酶活性成正相关<sup>[32]</sup>。然而本研究发现, 玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中几丁质酶基因显著上调表达, 说明几丁质酶在玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中的作用不容忽视, 真菌极有可能通过产生过量几丁质酶来破坏昆虫体壁成分。

此外, 分析还发现胞外蛋白酶在这一时期过量产生, 蛋白酶被认为在虫生真菌破坏寄主

过程中发挥重要作用,其活性高低可作为判断真菌菌株毒力高低的重要依据<sup>[12]</sup>。胞外蛋白酶是调节特定蛋白质合成和删除错误折叠蛋白的一个重要机制,其与细胞周期、分化、信号转导和免疫应答等多种细胞功能有关。已有研究发现超量表达胞外蛋白酶基因可使金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)对寄主昆虫的致死时间缩短 25%<sup>[33]</sup>。研究发现过量表达昆虫血腔中的表皮降解蛋白酶有助于降解寄主的免疫蛋白和脱毒蛋白,从而降低寄主的免疫能力,缩短杀死寄主的时间<sup>[34]</sup>。本研究发现丝氨酸蛋白酶在玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中显著上调表达,提示该胞外蛋白酶在玫烟色棒束孢侵染寄主过程中发挥重要作用。

已有研究报道,疏水蛋白在真菌侵染寄主过程中同样发挥重要作用。疏水蛋白是一类在真菌中分布广泛、功能多样的蛋白,在包括致病等许多重要的过程中发挥着重要的作用。通过基因敲除技术对球孢白僵菌的 2 个疏水蛋白基因 *HYD1* 和 *HYD2* 进行了功能研究,结果表明, *HYD1* 是球孢白僵菌的毒力因子,是形成其孢子表面疏水杆层的主要结构蛋白,但该蛋白对寄主体表的粘附不起作用;而 *HYD2* 主要参与对寄主体表的粘附作用,有助于 *HYD1* 在球孢白僵菌孢子表面形成完整的疏水杆层结构,但该蛋白与球孢白僵菌的毒力无关<sup>[35]</sup>。本研究发现疏水蛋白基因在真菌侵染小菜蛾过程中显著上调表达,说明该疏水蛋白基因在玫烟色棒束孢侵染寄主过程可能发挥重要作用,但其具体功能有待进一步研究。

虫生真菌对寄主的致病是一个复杂的过程,是受多条通路、多个基因控制的结果。据报道,真菌在侵染寄主过程中,在其降解昆虫体壁时释放出大量氨基酸和糖类,为了充分利用这些物质作为能量来源,虫生真菌会表达一

类转运蛋白来完成这些能量物质的运输。然而本研究发现参与碳水化合物运输的蔗糖转运蛋白,其在玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中显著上调,提示该基因有可能参与玫烟色棒束孢对小菜蛾的致病过程,其具体功能有待进一步探讨。

Water-soluble carbohydrate (WSC) 结构域是一类具有碳水化合物结合功能的区域<sup>[36]</sup>。目前已在真菌、病毒、细菌及哺乳动物中发现了超过 80 种 WSC 结构域蛋白(WSC domain-containing proteins)<sup>[37]</sup>。陈颖<sup>[38]</sup>利用生物信息学方法在已注释的球孢白僵菌的基因组中找到了 13 个包含 WSC 结构域的蛋白,作者通过构建各 WSC 蛋白的单基因缺失突变株及多表型分析发现,13 个 WSC 结构域蛋白对维持细胞壁的完整性和细胞功能十分重要;其中, *Wsc1*、*Wsc2* 和 *Wsc4* 主要影响真菌的生长, *Wsc3* 和 *Wsc4* 主要参与调控产孢, *Wsc2-5* 和 *Wsc8* 对球孢白僵菌的耐高温能力具有重要作用;通过毒力测定发现,除部分敲除株经体壁侵染的毒力下降外,所有敲除菌株经血腔注射侵染测验其毒力并未受到显著影响,说明 WSC 结构域蛋白在球孢白僵菌入侵寄主体壁的过程中主要发挥生物学作用。研究表明大多数 WSC 蛋白还参与调控抗氧化、抗杀菌剂以及耐碱性环境的胁迫反应。本研究在玫烟色棒束孢侵染小菜蛾的差异表达基因中,获得 3 条 WSC 结构域蛋白基因,其中 1 条显著上调表达,2 条基因均下调表达。推测 WSC 结构域蛋白基因在玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中可能发挥多种重要的生物学作用,具体功能有待进一步研究。

另外,参与信号传导、调节细胞凋亡及催化蛋白质折叠的亲环素蛋白、次生代谢物质蓖麻毒素 B 凝集素,参与膜泡转运、参与胞吐作用的磷脂酰肌醇转移蛋白以及参与酶解蛋白质

产物的肽酶及细胞膜外蛋白、胞外丝氨酸苏氨酸富集蛋白等潜在致病相关基因均显著上调表达,但它们的功能均有待进一步研究。此外,本研究中所有显著差异表达基因具体在玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中的哪个时间点表达、表达量如何等均有待采用 qPCR 技术进一步验证。

本次转录组测序,我们从处理组的 12 346 987 条 M 序列中,仅鉴定到约 4.5 万个序列,约占全部序列的 0.36%,这个比例说明玫烟色棒束孢 IFCF01 在其侵染小菜蛾的整个混合样本中所占的生物量极少,同时也说明玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程还处于一个早期阶段。类似的研究<sup>[39]</sup>也发现,在稻瘟菌接种水稻 24 h 时的研究中,该研究在 31 025 个 SAGE 标签中只鉴定到 17 个来源于稻瘟菌的序列,约占全部序列数的 0.55%;另外,在稻瘟菌侵染水稻 36 h 的混合样品中,经转录组测序后,也只检测到约占全部序列 2.7%的稻瘟病菌序列。上述研究说明,病原菌在侵染寄主早期,由于病原菌本身生物量所占的比例极少,而且截至目前尚无一种方法可以有效地分离真菌侵染寄主时混合样品中的病原真菌,进而对其进行单独测序。然而活体寄生的病原真菌是研究真菌致病机理的理想试验材料,这已在多种病原真菌侵染寄主时的基因表达研究中得到证明<sup>[40-41]</sup>,但由于活体取材的转录本大部分来源于寄主,病原真菌的转录本只占病原菌-寄主混合转录本的很少一部分,有可能由于基因丰度不足而造成部分重要基因序列信息的遗漏。

以往报道的对虫生真菌致病分子机理研究中,有研究者采用在液体培养基中添加昆虫表皮或血淋巴的方法模拟寄主昆虫的生理环境,诱导虫生真菌侵染过程中的基因表达<sup>[42-43]</sup>,而

液体培养环境与自然状态下寄主的体表环境存在较大的差别,其基因表达也会存在一定差别。另有研究者采用模拟病原菌在自然状态下侵染寄主表皮时的基因表达情况,对绿僵菌侵染宿主昆虫体表时的基因表达情况进行研究,通过构建其全长均一化的 cDNA 文库,经 EST 序列测定与分析,共获得了 4 739 条单一基因序列,其中 80%序列是采用其他方法未发现过的绿僵菌基因序列,说明该方法比较真实地反映了绿僵菌侵染宿主昆虫体表时的基因表达情况。以上结果说明,液体诱导的培养基并不能真实模拟绿僵菌侵染寄主体表时的环境条件,而模拟菌体在自然状态下侵染寄主表皮的方法也不能完全反映活体寄生的病原真菌基因的表达情况。基于此,以离体培养(用含小菜蛾幼虫表皮/血淋巴的液体培养基培养、用小菜蛾幼虫表皮模拟活体培养)的玫烟色棒束孢对小菜蛾致病过程中基因的表达情况有待进一步研究,以更全面地反映玫烟色棒束孢侵染小菜蛾过程中基因的表达情况。

本研究对高毒力玫烟色棒束孢菌株侵染小菜蛾不同时间混合样品进行转录组测序分析,获得了一些参与昆虫体壁降解、营养物质的转运、调控碳水化合物代谢、信号传导途径、次生代谢物合成等与真菌侵染及致病相关的基因。研究结果为后续玫烟色棒束孢毒力基因的挖掘、基因表达动态及功能基因验证提供了候选目标。此外,我们还获得了一些未见报道的可能与侵染相关的基因,这些基因在真菌侵染寄主过程中的作用有待进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Talekar NS, Shelton AM. Biology, ecology, and management of the diamondback moth[J]. Annual Review of Entomology, 1993, 38(1): 275-301

- [2] Sarfraz M, Keddie AB, Dosdall LM. Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: a review[J]. Biocontrol Science and Technology, 2005, 15(8): 763-789
- [3] Grzywacz D, Rossbach A, Rauf A, Russell DA, Srinivasan R, Shelton AM. Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassicas in Asia and Africa[J]. Crop Protection, 2010, 29(1): 68-79
- [4] Etebari K, Furlong MJ, Asgari S. Genome wide discovery of long intergenic non-coding RNAs in diamondback moth (*Plutella xylostella*) and their expression in insecticide resistant strains[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14642
- [5] Duarte RT, Gonçalves KC, Espinosa DJL, Moreira LF, De Bortoli SA, Humber RA, Polanczyk RA. Potential of entomopathogenic fungi as biological control agents of diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*) and compatibility with chemical insecticides[J]. Journal of Economic Entomology, 2016, 109(2): 594-601
- [6] 雷妍圆, 吕利华, 何余容. 玫烟色棒束孢 SCAU-IFCF01 产酶特性研究[J]. 环境昆虫学报, 2017, 39(5): 1000-1006
- Lei YY, Lyu LH, He YR. Study on induction of enzyme activity of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* SCAU-IFCF01[J]. Journal of Environmental Entomology, 2017, 39(5): 1000-1006 (in Chinese)
- [7] Nian XG, He YR, Lu LH, Zhao R. Evaluation of alternative *Plutella xylostella* control by two *Isaria fumosorosea* conidial formulations-oil-based formulation and wettable powder-combined with *Bacillus thuringiensis*[J]. Pest Management Science, 2015, 71(12): 1675-1684
- [8] 么瑞娜. 玫烟色棒束孢 cDNA 文库的构建及与小菜蛾 *serpin* 基因的互作因子筛选[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2017
- Yao RN. Construction of cDNA library of *Isaria fumosorosea* and screening of interaction factors from library against *serpin* from *Plutella xylostella*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [9] 王宏民, 赵义涛, 郭恒, 张仙红. 两种表面活性剂对玫烟色棒束孢 PF904 菌株侵染小菜蛾幼虫的影响[J]. 昆虫学报, 2021, 64(2): 205-212
- Wang HM, Zhao YT, Guo H, Zhang XH. Influence of two surfactants on the infection of *Isaria fumosorosea* strain PF904 on *Plutella xylostella* (*Lepidoptera: Plutellidae*) larvae[J]. Acta Entomologica Sinica, 2021, 64(2): 205-212 (in Chinese)
- [10] 黄宇. 玫烟色棒束孢 *Ifcdp1* 基因的功能研究[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2017
- Huang Y. Functional analysis of *Ifcdp1* gene from *Isaria fumosorosea*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [11] 李赫. 玫烟色棒束孢 Pr1 酶与毒力的关系及对小菜蛾幼虫血细胞凋亡的影响[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2016
- Li H. Correlation between Pr1 protease and strain virulence of *Isaria fumosorosea* and the influence of cellular apoptosis for *Plutella xylostella* larvae[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [12] 张腾飞, 张航航, 周红霞, 朱虹. 球孢白僵菌对小菜蛾的侵染相关基因分析[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(3): 388-397
- Zhang TF, Zhang HH, Zhou HX, Zhu H. Analysis of the infection related genes of *Beauveria bassiana* against *Plutella xylostella*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(3): 388-397 (in Chinese)
- [13] Wang JJ, Bai WW, Zhou W, Liu J, Chen J, Liu XY, Xiang TT, Liu RH, Wang WH, Zhang BL, et al. Transcriptomic analysis of two *Beauveria bassiana* strains grown on cuticle extracts of the silkworm uncovers their different metabolic response at early infection stage[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2017, 145: 45-54
- [14] 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 Genet, 2011, 7(1): e1001264
- [15] 吕利华, 何余容, 武亚敬, 冯夏, 陈焕瑜. 玫烟色拟青霉对小菜蛾致病力的时间-剂量-死亡率模型模拟[J]. 昆虫学报, 2007, 50(6): 567-573
- Lyu LH, He YR, Wu YJ, Feng X, Chen HY. The time-dose-mortality model of a *Paecilomyces fumosoroseus* isolate on the diamondback moth, *Plutella xylostella*[J]. Acta Entomologica Sinica, 2007, 50(6): 567-573 (in Chinese)
- [16] 雷妍圆, 何余容, 吕利华. 玫烟色棒束孢侵染小菜蛾的透射电镜观察[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(2): 319-323
- Lei YY, He YR, Lyu LH. Observation of infection process of *Isaria fumosorosea* to *Plutella xylostella*



- with transmission electron microscopy[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2011, 48(2): 319-323 (in Chinese)
- [17] 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
- [18] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. Bioinformatics(Oxford, England), 2010, 26(1): 139-140
- [19] Ye J, Fang L, Zheng HK, Zhang Y, Chen J, Zhang ZJ, Wang J, Li ST, Li RQ, Bolund L, et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(suppl\_2): W293-W297
- [20] Li RQ, Yu C, Li YR, Lam TW, Yiu SM, Kristiansen K, Wang J. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment[J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1966-1967
- [21] Yin YL, Yu GJ, Chen YJ, Jiang S, Wang M, Jin YX, Lan XQ, Liang Y, Sun H. Genome-wide transcriptome and proteome analysis on different developmental stages of *Cordyceps militaris*[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51853
- [22] Kim J, Oh J, Yoon DH, Sung GH. Identification of calmodulin binding proteins in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Folia Microbiologica, 2018, 63(1): 13-16
- [23] Kim J, Sung GH. Beauvericin synthetase contains a calmodulin binding motif in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2018, 64(3): 145-147
- [24] Kim J, Oh J, Yoon DH, Sung GH. Suppression of a methionine synthase by calmodulin under environmental stress in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Environmental Microbiology Reports, 2017, 9(5): 612-617
- [25] O'Day DH. CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins[J]. Cellular Signalling, 2003, 15(4): 347-354
- [26] Cyert MS. Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Annual Review of Genetics, 2001, 35(1): 647-672
- [27] Reddy ASN, Ali GS, Celesnik H, Day IS. Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression[J]. The Plant Cell, 2011, 23(6): 2010-2032
- [28] 陈孙孝. 白念珠菌钙调蛋白基因(*CMD1*)缺陷菌株的构建及 *CMD1* 功能性基因的初步研究[D]. 上海: 第二军医大学博士学位论文, 2001
- Chen SX. Construction of *Candida albican* calmodulin (*CMD1*) gene-deleted yeast and study on *CMD1* functional base[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Second Military Medical University, 2001 (in Chinese)
- [29] 刘锐, 杨涛, 朱婷, 任昂, 师亮, 赵明文. 灵芝钙调蛋白基因 *CaM* 的克隆与功能分析[J]. 菌物学报, 2020, 39(1): 66-74
- Liu R, Yang T, Zhu T, Ren A, Shi L, Zhao MW. Cloning and functional analysis of a calmodulin gene in *Ganoderma lingzhi*[J]. Mycosystema, 2020, 39(1): 66-74 (in Chinese)
- [30] Gillespie JP, Burnett C, Charnley AK. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*[J]. Journal of Insect Physiology, 2000, 46(4): 429-437
- [31] Huang Z, Hao YF, Gao TN, Huang Y, Ren SX, Keyhani NO. The Ifchit1 chitinase gene acts as a critical virulence factor in the insect pathogenic fungus *Isaria fumosorosea*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(12): 5491-5503
- [32] 李茂业. 对褐飞虱高毒力的真菌菌株筛选及其应用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学博士学位论文, 2012
- Li MY. Study on screen for high virulence strain of entomopathogenic fungus against *Nilaparvata lugens* and its application[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of Anhui Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [33] St Leger R, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease[J]. PNAS, 1996, 93(13): 6349-6354
- [34] 贺阔. 植物病原真菌与昆虫病原真菌侵染寄主表皮分子机制研究[D]. 重庆: 重庆大学博士学位论文, 2012
- He M. Studies on molecular mechanisms of host cuticle infection by phytopathogenic and entomopathogenic fungus[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Chongqing University, 2012 (in Chinese)
- [35] Zhang SZ, Xia YX, Kim B, Keyhani NO. 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
- [36] Dupres V, Heinisch JJ, Dufrêne YF. Atomic force microscopy demonstrates that disulfide bridges are

- required for clustering of the yeast cell wall integrity sensor Wsc1[J]. *Langmuir*, 2011, 27(24): 15129-15134
- [37] Rodicio R, Heinisch JJ. Together we are strong-cell wall integrity sensors in yeasts[J]. *Yeast* (Chichester, England), 2010, 27(8): 531-540
- [38] 陈颖. 胞壁完整性相关的 20 个信号转导与效应蛋白的功能分析及其与昆虫病原真菌生防潜能的关系[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2014
- Chen Y. Functional characterization of 20 signaling and effector proteins essential for cell wall integrity and their connections to biocontrol potential of entomopathogenic fungi[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2014 (in Chinese)
- [39] Gowda M, Venu RC, Li HM, Jantasuriyarat C, Chen SB, Bellizzi M, Pampanwar V, Kim H, Dean RA, Stahlberg E, et al. *Magnaporthe oryzae* infection triggers RNA variation and antisense transcript expression in rice[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(1): 524-533
- [40] Goswami RS, Xu JR, Trail F, Hilburn K, Kistler HC. Genomic analysis of host-pathogen interaction between *Fusarium graminearum* and wheat during early stages of disease development[J]. *Microbiology* (Reading, England), 2006, 152(Pt 6): 1877-1890
- [41] Mosquera G, Giraldo MC, Khang CH, Coughlan S, Valent B. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(4): 1273-1290
- [42] Freimoser FM, Hu G, St Leger RJ. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*[J]. *Microbiology*(Reading, England), 2005, 151(Pt 2): 361-371
- [43] Wang CS, Hu G, St Leger RJ. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42(8): 704-718