# 淡紫紫孢菌侵染烟粉虱的效应因子预测及其表达分析

官昭瑛[1] 雷妍圆[2*] 许建新[1] 张 杰[1] Hussin Abid[3] 章玉苹[2]

（1. 深圳城市职业学院，广东 深圳 518116；2. 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；3. 沙特阿拉伯环境、水和农业部，利雅得 11442）

**摘要：**为明确效应因子在淡紫紫孢菌*Purpureocillium lilacinum*致病过程中的作用，基于该菌已公布的全基因组信息，对其全部11 763个蛋白序列进行生物信息学分析以筛选候选效应因子，并通过实时荧光定量PCR技术分析候选效应因子在烟粉虱*Bemisia tabaci*不同发育阶段（卵、2龄若虫和雌成虫）的表达模式。结果显示：在11 763个蛋白序列中，利用SignalP 5.0软件预测获得1 072个含信号肽的蛋白；进一步通过TMHMM 2.0软件从中筛选出跨膜结构域少于2个的蛋白有1 048个；再经TargetP 2.0软件预测其中有1 044个蛋白的信号肽定位于分泌途径；最后通过ProtComp 9.0软件分析发现其中653个蛋白可能位于细胞外。从中筛选出半胱氨酸含量大于6的蛋白396个，通过T-Reks分析鉴定出119个蛋白具有串联重复序列，经病原物−寄主互作数据库注释，其中有43个蛋白获得功能信息。从中选取长度小于300个氨基酸的9个蛋白，根据突变表型预测筛选出8个与致病相关的潜在效应因子，其中6个效应因子的编码基因在烟粉虱雌成虫粗提物诱导下表达水平随时间升高，且雌成虫诱导效应强于2龄若虫和卵，尤以*PlEF5*和*PlEF8*基因在48 h表达量最高，分别达对照的35.9倍和38.5倍；*PlEF6*基因在所有处理中均持续下调。表明淡紫紫孢菌对烟粉虱不同虫态的体表信号具有差异化响应，筛选出的效应因子可作为病原真菌−烟粉虱互作研究的关键靶点。

**关键词：**淡紫紫孢菌；烟粉虱；效应因子；生物信息学预测；时序表达分析

## Prediction and expression analysis of effectors in *Purpureocillium lilacinum* infecting tobacco whitefly *Bemisia tabaci*

Guan Zhaoying[1] Lei Yanyuan[2*] Xu Jianxin[1] Zhang Jie[1] Hussin Abid[3] Zhang Yuping[2]

（1. Shenzhen City Polytechnic, Shenzhen 518116, Guangdong Province, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China; 3. Ministry of Environment, Water and Agriculture, Riyadh 11442, Saudi Arabia）

**Abstract:** To clarify the role of effectors in the pathogenic process of *Purpureocillium lilacinum* against its insect host, candidate effectors were systematically predicted based on the published whole-genome information of this fungus. Bioinformatics analysis was performed on all 11 763 protein sequences to screen candidate effectors, and their expression patterns in response to crude extracts from different developmental stages of tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (eggs, second-instar nymphs and female adults) were analyzed by real-time quantitative PCR. The results showed that 1 072 proteins containing signal peptides were predicted using SignalP 5.0; 1 048 proteins with fewer than two transmembrane

基金项目：广东省普通高校工程技术研究（开发）中心项目（2024GCZX016），广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目（2026CXTD21），广东省科技计划项目（2020A1414010040）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：leiyanyuan@gdaas.cn

收稿日期：2026-05-20

domains were further screened using TMHMM 2.0; TargetP 2.0 predicted that the signal peptides of 1 044 proteins were localized to the secretory pathway; and ProtComp 9.0 indicated that 653 proteins were potentially extracellular. Among these proteins, 396 had more than six cysteine residues, 119 contained tandem repeats according to T-Reks analysis, and 43 were functionally annotated in the pathogen-host interaction database. Nine proteins shorter than 300 amino acids were selected, and eight potential pathogenicity-related effectors were predicted based on mutant phenotypes. Among them, the coding genes of six effectors showed increased expression over time under induction by crude extracts of *B. tabaci* female adults, and the induction effect of female adults was stronger than that of 2nd-instar nymphs and eggs. In particular, *PlEF5* and *PlEF8* exhibited the highest expression levels at 48 h (35.9- and 38.5-fold that of the control, respectively). In contrast, *PlEF6* was continuously downregulated in all treatments. These results indicate that *P. lilacinum* responds differentially to surface signals from different developmental stages of *B. tabaci*, and the screened effectors may serve as key targets for further research on pathogen fungus-*B. tabaci* interactions.

**Key words:** *Purpureocillium lilacinum*; *Bemisia tabaci*; effectors; bioinformatics prediction; temporal expression analysis

效应因子是病原菌在侵染寄主过程中分泌的一类功能蛋白，能进入宿主细胞，通过干扰寄主免疫反应、调控寄主细胞生理活动或修饰寄主微环境等方式，协助病原菌完成侵染、定殖与致病（Ramachandran et al.，2017；董章勇等，2019）。效应因子在病原真菌与寄主的互作过程中扮演着至关重要的角色（Todd et al.，2022）。近年来对微生物效应因子的研究深入至基因组水平，其功能解析已成为病原菌致病机制和寄主抗性调控网络研究的核心方向，为揭示微生物与宿主相互作用的分子机制提供了新的视角和工具（Kainat et al.，2025）。

烟粉虱*Bemisia tabaci*是一种世界性害虫，通过刺吸式口器吸取植物汁液，并分泌蜜露诱发煤污病，还可传播多种植物病毒，对多种蔬菜和经济作物生产构成严重威胁，造成重大的经济损失（常晓丽等，2024；Kavallieratos et al.，2024）。在众多防治手段中，以生防真菌为核心菌种的微生物菌剂因其环境友好和可持续性而备受关注。淡紫紫孢菌*Purpureocillium lilacinum*（原淡紫拟青霉*Paecilomyces lilacinus*）是一种广谱性生防真菌，已被证实对烟粉虱具有良好的生防效果（古开平等，2022；郝轩卉和刘守柱，2024；Zhai et al.，2025）。淡紫紫孢菌对不同门类寄主（线虫与昆虫）的跨界致病能力，使其成为研究病原真菌寄主适应性与专化性机制的理想模式种。然而，该菌虽具备良好的生防应用潜力，但作为微生物菌剂田间施用时，易受环境因素和定殖能力的影响，存在见效慢、防效不稳定等问题。

效应因子的功能解析是探究淡紫紫孢菌寄主适应性与侵染效率的关键。作为决定真菌侵染效率的核心毒力因子，效应因子在调控寄主免疫与促进定殖过程中发挥着重要作用。目前，对淡紫紫孢菌生防机制的研究多集中于其对线虫的致病过程（杨凡等，2023；Rigobelo et al.，2024），而对其侵染昆虫寄主所涉及的效应因子及分子机制知之甚少（Liu et al.，2022）。根据真菌效应因子的保守基序，大部分效应因子属于分泌蛋白，主要具有特异性高、氨基酸残基序列长度范围一般为50~300个、含N-端信号肽编码序列但无跨膜区和糖基磷脂酰肌醇（glycosylphosphatidylinositol，GPI）锚定位点、富含半胱氨酸残基等特征（Jones & Dangl，2006；Bolton et al.，2008；Stergiopoulos & de Wit，2009）。真菌效应因子通过靶向寄主基因表达调控侵染进程，抑制寄主防御相关基因以削弱免疫反应。例如稻瘟菌*Magnaporthe oryzae*效应因子通过干扰宿主过氧化氢代谢途径，抑制活性氧积累（Zhu et al.，2023）。另有些效应因子可抑制植物丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路或茉莉酸、水杨酸等激素信号通路的关键基因，从而阻断免疫信号的传递（Zhang et al.，2025）。部分效应因子通过激活宿主易感基因间接促进病害发展。如啤酒花矮化类病毒（hop stunt viroid，HSVd）侵染苹果腐烂病菌*Valsa mali*后，通过调控其基因表达降低其生长速度和致病性（Wei et al.，2019）。效应因子在真菌活体寄生的早期阶段被诱导表达（Cheng et al.，2010；Kleemann et al.，2012），在结构、功能、分泌机制及作用位点上具有多样性（Tariqjaveed et al.，

2021；Zhu et al.，2023），其与寄主的互作模式在进化中呈现动态适应特点（Huang et al.，2024）。

本研究以公布的淡紫紫孢菌全基因组信息为基础（Wang et al.，2016），基于前期完成的淡紫紫孢菌菌株PlGD05的转录组测序，结合效应因子典型特征和数据库资源，对候选效应因子进行预测和表达分析，以期为解析淡紫紫孢菌侵染烟粉虱的分子机制提供新线索，也为开发兼具杀虫与杀线虫潜力的新型生物制剂提供理论基础和候选基因资源。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

供试昆虫：烟粉虱采自广东省农业科学院白云基地的甘蓝 *Brassica oleracea* var. *capitata* 上，参照Pan et al.（2012）方法鉴定为B型烟粉虱，于室内用甘蓝饲养繁殖多代，期间未接触任何化学农药或生物农药。待烟粉虱成虫在甘蓝上产卵1 d后，吹走全部成虫，剪下带卵的甘蓝叶片，用软毛笔将卵轻轻刷下，作为卵样本供试；剩余带卵叶片继续饲养，每日观察卵孵化情况，待若虫发育至2龄时，用毛笔将若虫从叶背挑下收集供试；待成虫羽化后1 d，收集雌成虫供试。各发育阶段样本均于−80 ℃保存备用。

供试菌株：淡紫紫孢菌菌株PlGD05由广东省农业科学院植物保护研究所保藏并提供。将其接种于马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）平板上，于28 ℃培养10 d后，刮取分生孢子，用灭菌0.05%吐温80溶液配制成$1\times10^7$个/mL的孢子悬浮液供试。

PDA培养基：马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉20 g，去离子水定容至1 L，121 ℃高压灭菌20 min。

试剂和仪器：Trizol试剂，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒，宝日医生物技术（北京）有限公司；PerfectStart® Green qPCR SuperMix，北京全式金生物技术股份有限公司，其他试剂均为国产分析纯。ALPHA 2-4 LSCbasic冷冻干燥机，德采实仪器设备（北京）有限公司；KQ-250DE超声提取仪，昆山市超声仪器有限公司；5424R高速冷冻离心机，艾本德（上海）国际贸易有限公司；Nano Drop One超微量紫外分光光度计，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；CFX96 Touch实时荧光定量PCR仪，伯乐生命医学产品（上海）有限公司；MJ-250-I霉菌培养箱，上海一恒科学仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 淡紫紫孢菌基因组的生物信息学分析

从NCBI数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome）下载淡紫紫孢菌菌株PLFJ-1的全基因组序列及注释文件，其基因组Assembly登录号为GCF_001653265.1（注释版本为ASM165326v1）。本团队前期转录组数据分析表明，本研究所用淡紫紫孢菌菌株PlGD05的序列与PLFJ-1菌株的基因组具有较高的覆盖度。因此，本研究以PLFJ-1基因组为参考，将其注释的11 763条蛋白序列用于候选效应因子筛选。

经典的真菌效应因子需通过分泌系统外排或注入寄主细胞，因此其序列N端必须带有信号肽，以引导蛋白进入分泌途径。针对PLFJ-1参考基因组，利用SignalP 5.0软件预测其注释的11 763条蛋白序列是否含有信号肽（Petersen et al.，2011），整合多种人工神经网络算法和隐马尔可夫模型双算法体系，定位潜在信号肽切割位点。通过特征参数*C*值（原始切割位点评分）、*S*值（信号肽概率评分）、*Y*值（综合切割位点评分）、mean *S*（信号肽区域平均*S*值）和*D*值（信号肽判别阈值）进行联合判读，当检测到*Y*值曲线呈现显著峰型特征时，其峰值坐标即对应信号肽切割位点（Barash et al.，2002）。候选序列不应含有明显的跨膜结构域，以排除定位于细胞膜的非分泌蛋白。对上述预测含有信号肽的蛋白，采用TMHMM 2.0软件对其跨膜结构域进行分析（Krogh et al.，2001），定量检测跨膜螺旋数量及其氨基酸序列跨度，同时提供全蛋白长度、N端前60个氨基酸的跨膜螺旋分布特征以及拓扑结构等参数，最终过滤含跨膜螺旋结构的蛋白。对上述经过信号肽预测和跨膜结构域筛选的蛋白，通过TargetP 2.0平台（Emanuelsson et al.，2007）进行转运肽识别，鉴别线粒体靶向肽、叶绿体转运肽及分泌型信号肽的特征序列，建立蛋白质亚细胞定位图谱，筛选出具有胞外定位特征的蛋白。基于ProtComp 9.0生物信息学平台（Emanuelsson et al.，2000）对含有N端信号肽的蛋白质进行亚细胞定位预测，构建目标蛋白的亚细胞定位特征谱。

### 1.2.2 分泌蛋白的半胱氨酸含量和串联重复序列分析

半胱氨酸残基可形成分子内二硫键，这对于维持效应因子在富含水解酶的寄主环境中的结构稳定性至关重要，是其发挥功能的重要保障。对1.2.1中筛选获得的候选蛋白质序列，同步开展半胱氨酸丰度分析与多串联重复序列检测，通过Perl脚本实现

半胱氨酸含量阈值筛选(半胱氨酸残基数>6)。串联重复单元被认为是效应因子与寄主靶标互作的热点区域,其序列变异是病原菌逃避寄主免疫识别的关键驱动力之一,采用T-Reks软件(http://bioinfo.montp.cnrs.fr/?r=t-reks/)完成串联重复序列的系统性识别(Jorda & Kajava,2009)。利用T-Reks软件通过*K*-均值算法扫描蛋白质序列并生成对应*E*值,当一个重复单元的*E*值低于软件预设的阈值(如小于0.05)时认为该重复结构显著。

**1.2.3** *淡紫紫孢菌效应因子的功能预测*

采用病原菌与寄主互作(pathogen-host interaction,PHI)数据库(http://www.phi-base.org/)对1.2.2中所得蛋白质序列进行功能注释分析(Winnenburg et al.,2008)。该数据库整合了经试验验证的致病相关基因数据,涵盖真菌、细菌和线虫等病原体与植物、脊椎动物、昆虫等宿主的互作信息。通过同源比对预测淡紫紫孢菌蛋白在侵染寄主过程中的生物学功能,筛选出与致病性相关的蛋白。在此基础上进行候选效应因子的长度筛选,鉴于小蛋白更易高效分泌并在寄主组织中扩散,而过长蛋白因结构复杂转运受限,短肽(<50个氨基酸)功能域又常不全,故将长度介于50~300个氨基酸的致病相关蛋白作为该菌的候选效应因子。

**1.2.4** *淡紫紫孢菌效应因子表达模式分析*

将烟粉虱卵、2龄若虫和雌成虫样本用无菌蒸馏水反复漂洗3次,滤纸吸干表面水分后,置于冷冻干燥机中−30 ℃冷冻干燥至恒重,加入液氮磨成粉末,称取粉末按质量体积比1∶10与二氯甲烷和甲醇混合液(按体积比2∶1配制)混匀,室温下密封超声提取30 min,4 ℃静置过夜。然后以12 000×*g*离心10 min,收集上清液,沉淀重复提取1次,合并两次上清液,于40 ℃蒸发浓缩至干得到粗提物。将粗提物用适量无水乙醇溶解,再用无菌水溶液复溶,经0.22 μm滤膜过滤后,于−20 ℃保存备用。为分析烟粉虱虫体粗提物对淡紫紫孢菌效应因子表达的诱导作用,分别吸取各虫态虫体粗提物溶液100 μL均匀涂布于铺有灭菌玻璃纸的1.5%水琼脂平板表面,吹干后再均匀涂布100 μL淡紫紫孢菌菌株PlGD05孢子悬浮液,以仅均匀涂布等量孢子悬浮液的1.5%水琼脂平板为对照。两组处理均于28 ℃避光培养。根据预试验显微观察,淡紫紫孢菌分生孢子在该条件下培养16~24 h期间开始萌发并形成芽管(附着胞分化初期),培养至48 h时附着胞大量形成且形态成熟,此阶段在扫描电镜下对应附着胞穿透寄主表皮的关键时期。因此,分别于各处理培养24 h和48 h取样,用灭菌刮铲轻轻刮取玻璃纸表面的菌体,液氮速冻后于−80 ℃保存。每个处理3个生物学重复。

采用Trizol法提取上述各样品的总RNA(Kiefer et al.,2000)。使用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒将总RNA反转录合成第一链cDNA。针对1.2.3筛选获得的8个后续效应因子,利用NCBI数据库中的Premier-BLAST程序(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)设计候选效应因子基因序列特异性引物(表1),以*ef1-beta*(NCBI序列号为EH413796)作为内参基因进行实时荧光定量PCR检测。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。20 μL反应体系:2×Perfect-Start® Green qPCR Super Mix 10 μL、cDNA模板3 μL、10 μmol/L上下游引物各0.5 μL,无核酸酶水补足至终体积。反应条件:95 ℃预变性2 min;95 ℃变性10 s,各基因引物退火温度下(表1)退火20 s,72 ℃延伸20 s,共35个循环;72 ℃终延伸10 min。基因相对表达量通过$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算(Livak & Schmittgen,2001),分别以对照组相应时间点样本的表达量作为归一化基准。每个处理设3个生物学重复和3个技术重复。

### 1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 21.0软件进行统计分析,应用独立样本*t*检验法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 淡紫紫孢菌效应因子全基因组的生物信息学分析

从淡紫紫孢菌基因组数据库中下载全基因组序列,得到11 763条氨基酸序列,经SignalP 5.0软件预测分析得到具有N端信号肽特征的1 072个蛋白,占基因组总蛋白序列的9.11%。这些含信号肽的蛋白长度多集中于50~400 aa之间,所占比例达82.50%,其中66.38%的序列长度小于300 aa,以101~200 aa区段分布最多,有338个蛋白(图1)。通过TMHMM 2.0软件对1 072个具有信号肽的蛋白进行跨膜结构域预测,有904个蛋白序列不含跨膜结构域,168个含跨膜结构域,其中有144个仅含1个跨膜螺旋,有24个含2个以上跨膜螺旋。这144个单跨膜螺旋蛋白的跨膜区域均位于N端,推测该结构域可能与预测的信号肽序列存在重叠区域。鉴于跨膜结构域预测工具对信号肽与跨膜区的判别存在局限性,本研究将904个无跨膜结构域蛋白及144个单跨膜螺旋蛋白(共1 048个),通过TargetP 2.0平台进一步进行

亚细胞定位分析，排除非胞外分泌蛋白（线粒体、其他定位等）后，最终得到1 044个（占比为99.62%）含有胞外定位信号的分泌蛋白，其余0.38%为具有线粒体定位信号的非胞外分泌蛋白。

**表1 本研究所用引物信息**

Table 1 Primer information used in this study

| 基因名称 Gene name | 引物序列（5′−3′） Primer sequence (5′−3′) | 退火温度 Annealing temperature/℃ | 产物大小 Amplicon size/bp |
|---|---|---|---|
| *PlEF1* | F: TACCAACTGCTCACTGGACG<br>R: AGGACCTTGCCGATTGAGTC | 52 | 126 |
| *PlEF2* | F: CGCCTTCCTCGAGAACACAA<br>R: TTCTCCCCCTTGACGGGATA | 54 | 117 |
| *PlEF3* | F: GATGGACAAGGTCCAGAGCG<br>R: GTTGGCGCAGAGCTTCTTG | 54 | 106 |
| *PlEF4* | F: AGAAATGCCTCGACGACTCC<br>R: GCCCTGGATCTTCTCGACG | 56 | 92 |
| *PlEF5* | F: ATCCCCATCTCGACCACTGT<br>R: GATGGTGCTGTTGGGGTAGA | 52 | 75 |
| *PlEF6* | F: GCCTCGTTAGGGAAGCATCA<br>R: AGAGTCACAAGCCTGAACGG | 55 | 93 |
| *PlEF7* | F: AAGTACACTGCCGTCCTCAG<br>R: GCAGATGCAAGCAAAGTCGT | 56 | 147 |
| *PlEF8* | F: GCACCGACACGATCGACTAT<br>R: TAGTTGTTGTCGCGCTCACT | 56 | 127 |
| *ef1-beta* | F: TGAAGACCGATAAGGGCATC<br>R: TTCCCCAGTGCCTCAAATAC | 56 | 112 |

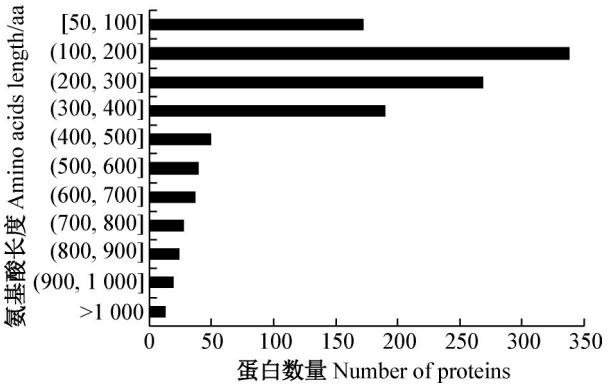



**图1 淡紫紫孢菌N端信号肽蛋白氨基酸长度分布**

Fig. 1 Length distribution of N-terminal signal peptide-containing proteins in *Purpureocillium lilacinum*

采用ProtComp 9.0软件对1 044个胞外分泌蛋白进行功能注释，653个为典型胞外分泌蛋白，其余391个蛋白并不分泌到细胞外围，其亚细胞分布分别定位到细胞核（5个，占比为0.48%）、细胞质（25个，占比为2.39%）、细胞膜（102个，占比为9.77%）、线粒体（164个，占比为15.71%）、内质网（32个，占比为3.07%）、过氧化物酶体（3个，占比为0.29%）、溶酶体（33个，占比为3.16%）、高尔基体（18个，占比为1.72%）、液泡（9个，占比为0.86%）（图2）。

## 2.2 分泌蛋白的半胱氨酸含量和串联重复序列分析

对淡紫紫孢菌653个胞外分泌蛋白进行半胱氨酸组成分析，筛选获得396个高半胱氨酸含量（≥6个）的候选效应因子，半胱氨酸的数量为6~57个，其中含6个半胱氨酸的蛋白最多，有103个（图3）。采用T-Reks软件对这396个蛋白进行串联重复序列分析，最终鉴定出119个具有显著串联重复结构的蛋白。

## 2.3 淡紫紫孢菌候选效应因子功能预测

对筛选获得的119个富含半胱氨酸且具有串联重复结构的候选效应因子与PHI数据库进行比对，获得43个注释匹配结果。从基因突变表型分类来看，这些候选效应因子分别为毒力减弱的蛋白（20个）、不影响致病力的蛋白（11个）、混合型的蛋白（7个）、在PHI数据库中经试验验证和注释的效应因子（4个）以及毒力增强的蛋白（1个），分别占注释匹配总数的46.51%、25.58%、16.28%、9.30%和2.33%。

## 2.4 淡紫紫孢菌致病相关候选效应因子分析

基于效应因子典型分子量特征，对PHI数据库注释蛋白进行长度筛选（氨基酸残基<300 aa），最终获得9个符合标准的小分子分泌蛋白，氨基酸长度

集中在141~267 aa之间(表2)。经功能注释分析,结合基因注释和突变表型结果,筛选出8个潜在致病相关候选效应因子,突变表型皆属于毒力减弱型,其中3个具有功能注释信息,分别为PlEF5(内切几丁质酶)、PlEF6(假定分泌蛋白)和PlEF8(毒力分泌相关蛋白)(表2)。

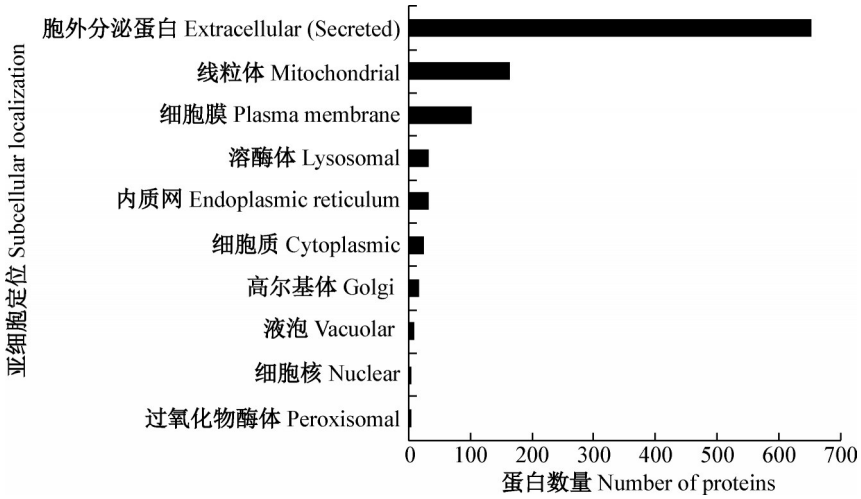



**图2 淡紫紫孢菌含有胞外定位信号的蛋白亚细胞定位**

Fig. 2 Subcellular localization of proteins predicted to be extracellular in *Purpureocillium lilacinum*

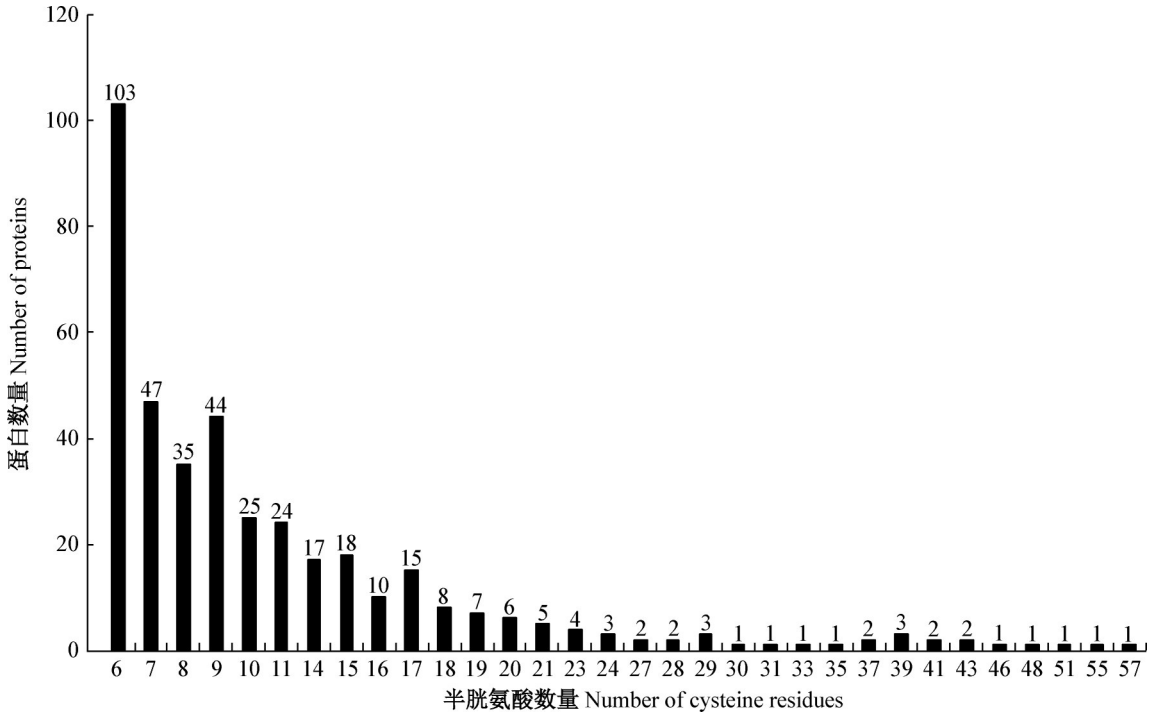



**图3 淡紫紫孢菌分泌蛋白的半胱氨酸数量分布**

Fig. 3 Distribution of cysteine residues in secreted proteins of *Purpureocillium lilacinum*

### 2.5 淡紫紫孢菌候选效应因子的表达特征分析

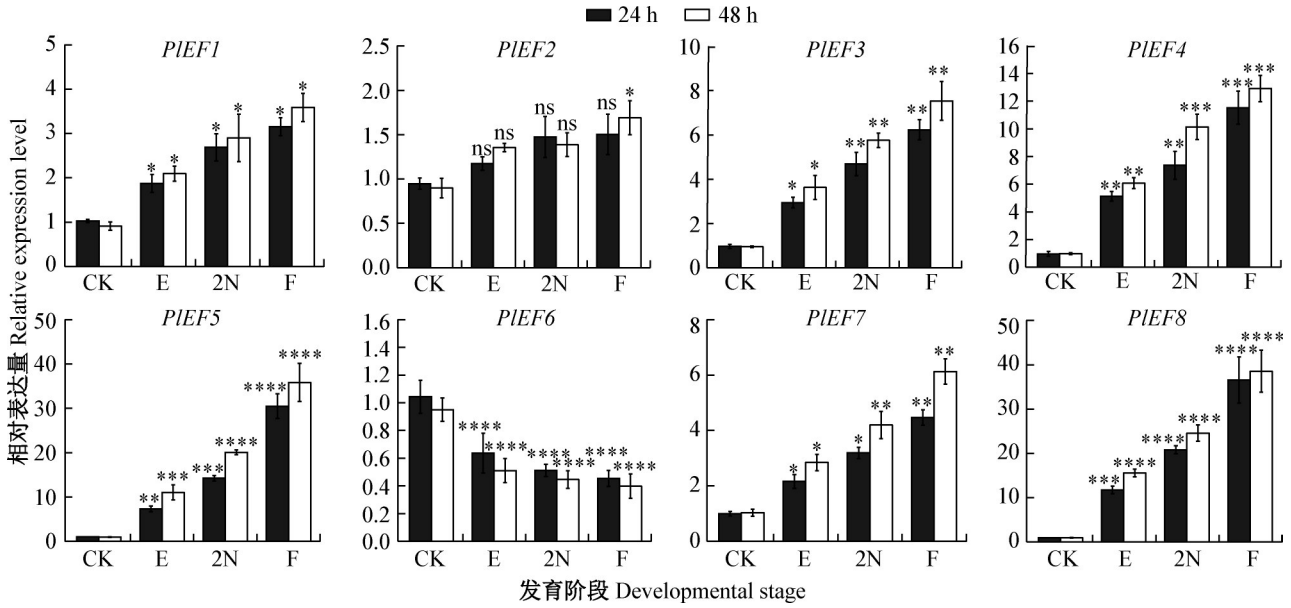
在烟粉虱卵、2龄若虫和雌成虫粗提物诱导下,*PlEF1*、*PlEF3*、*PlEF4*、*PlEF5*、*PlEF7*和*PlEF8*这6个基因在24 h和48 h时均显著上调表达,且上调幅度均表现为雌成虫处理>2龄若虫处理>卵处理;而*PlEF6*基因在24 h和48 h时均显著下调表达;*PlEF2*基因仅微弱上调(图4)。其中,雌成虫粗提物处理下*PlEF5*和*PlEF8*基因上调最显著,48 h时两者的相对表达量分别为对照的35.9倍和38.5倍;*PlEF4*和*PlEF1*基因的上调幅度次之,48 h时两者的相对表达量分别为对照的12.9倍和3.6倍(图4)。总体来看,各基因在淡紫紫孢菌附着胞形成与穿透高

峰期(48 h)的表达水平普遍高于萌发阶段(24 h)，表明淡紫紫孢菌对烟粉虱不同虫态的体表信号具有差异化响应，这些基因在穿透阶段的表达活性更高。

**表2 淡紫紫孢菌候选效应因子**

Table 2 Putative effectors of *Purpureocillium lilacinum*

| 效应因子 Effector | 蛋白编号 Protein ID | 氨基酸长度 Protein length/aa | 功能注释 Function annotation | 匹配物种 Matched species | 突变表型 Mutant phenotype |
|---|---|---|---|---|---|
| PlEF1 | XP_018182706 | 164 | 功能未知 Unknown function | 麦角菌 *Claviceps purpurea* | 毒力减弱 Reduced virulence |
| PlEF2 | XP_018183174 | 141 | 未知蛋白 Uncharacterized protein | 禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* | 毒力减弱 Reduced virulence |
| PlEF3 | XP_018183650 | 152 | 功能未知 Unknown function | 禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* | 毒力减弱 Reduced virulence |
| PlEF4 | XP_018181297 | 185 | 功能未知 Unknown function | 禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* | 毒力减弱 Reduced virulence |
| PlEF5 | XP_018178118 | 239 | 内切几丁质酶 Endochitinase | 金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* | 毒力减弱 Reduced virulence |
| PlEF6 | XP_018178182 | 259 | 假定分泌蛋白 Putative secreted protein | 灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* | 毒力减弱 Reduced virulence |
| PlEF7 | XP_018177671 | 170 | 功能未知 Unknown function | 禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* | 毒力减弱 Reduced virulence |
| PlEF8 | XP_018175544 | 267 | 分泌毒力相关蛋白 Secreted virulence-associated protein | 罗伯茨绿僵菌 *Metarhizium robertsii* | 毒力减弱 Reduced virulence |
| PlEF9 | XP_018182816 | 159 | 分泌蛋白 Secreted protein | 稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* | 不影响致病力 Unaffected pathogenicity |




CK：对照；E：卵；2N：2龄若虫；F：雌成虫。CK: Control; E: egg; 2N: 2nd-instar nymph; F: female adult.

**图4 烟粉虱不同发育阶段虫体粗提物诱导下淡紫紫孢菌PlGD05候选效应因子基因的表达模式**

Fig. 4 Expression patterns of eight candidate effector genes in *Purpureocillium lilacinum* strain PlGD05 induced by crude extracts from different developmental stages of *Bemisia tabaci*

图中数据为平均数±标准差。*、**、***和****表示同一时间点处理组与对照组经独立样本*t*检验法检验差异显著($P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.001$和$P<0.000\ 1$)，ns表示差异不显著。Data are mean±SD. *, **, *** and **** indicate significant differences between the treatment and control groups at the same time point according to an independent-samples *t* test ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ or $P<0.000\ 1$, respectively); ns indicates no significant difference.

## 3 讨论

现有昆虫病原真菌侵染机制研究主要聚焦于水解酶(如蛋白酶、几丁质酶)及其对寄主表皮的降解作用(Beys-da-Silva et al.,2014;Kordi et al.,2015)。近些年研究发现部分效应因子可能通过调节宿主免疫识别系统实现侵染增效(Liang et al.,2013;Tong et al.,2016a,b),其作用靶点包括模式识别受体及其下游信号转导网络(Block et al.,2008;Boller & He,2009)。然而,多数效应因子的功能仍未知,其介导的防御调控通路尚未阐明。本研究基于PHI数据库筛选淡紫紫孢菌候选效应因子,为解析其侵染烟粉虱的分子机制提供了切入点。PHI数据库注释信息主要来源于植物病原真菌模式菌株,对昆虫病原真菌覆盖度有限,且部分同源序列可能来自非致病相关基因,存在功能注释偏差。因此,通过同源比对获得的候选效应因子仅为预测,其物种特异性致病机制尚需通过基因敲除或过表达等遗传试验验证。受限于昆虫病原真菌遗传操作体系建立困难及效应因子作用通路的多元性(如直接干扰模式识别受体通路或调控防御基因表达),效应因子的功能解析仍面临巨大挑战。

本研究发现,淡紫紫孢菌8个候选效应因子在烟粉虱不同虫态粗提物诱导下呈现明显的表达差异,雌成虫处理组的诱导效应最强,2龄若虫的诱导效应次之,卵的诱导效应最弱。该梯度特征可能与不同虫态体壁结构差异存在密切关联,如成虫体壁几丁质含量最高,蜡质层最复杂,可能携带更多的真菌识别信号(如几丁质寡聚体),从而更有效地诱导效应因子表达(Ortiz-Urquiza & Keyhani,2013)。此外,多数效应因子在淡紫紫孢菌附着胞形成及穿透高峰期(48 h)的表达水平高于萌发阶段(24 h),表明其主要参与附着胞成熟及表皮穿透过程,而非早期信号识别。

淡紫紫孢菌*PlEF5*基因(编码内切几丁质酶)是诱导响应最强的效应因子,烟粉虱雌成虫粗提物处理48 h后其相对表达量高达到对照的35.9倍。几丁质酶是昆虫病原真菌降解寄主体壁几丁质成分的核心水解酶,在穿透表皮过程中发挥着关键作用。如金龟子绿僵菌*Metarhizium anisopliae*的内切几丁质酶基因*CHI2*敲除后对棉红蝽*Dysdercus peruvianus*的侵染效率显著降低(Boldo et al.,2009);球孢白僵菌*Beauveria bassiana*过表达*Bbchit1*后对蚜虫的毒力显著增强(Fang et al.,2005);淡紫紫孢菌在侵染桃蚜*Myzus persicae*和草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda*过程中,几丁质酶基因被鉴定为显著上调的致病相关基因之一(Liu et al.,2022)。淡紫紫孢菌*PlEF5*基因的显著诱导特征提示其在侵染烟粉虱雌成虫中具有重要功能,鉴于不同昆虫病原真菌的几丁质酶基因在进化上存在功能分化,后期需结合基因敲除、蛋白互作等手段进行功能验证,以明确其潜在作用方式。

此外,淡紫紫孢菌*PlEF6*基因(编码假定分泌蛋白)在所有处理中均呈显著持续下调,暗示其可能作为负调控因子参与侵染过程。效应因子在进化过程中常出现谱系特异性分化,不同真菌中同源效应蛋白的功能可能存在显著差异(Kainat et al.,2025)。*PlEF6*基因下调可能反映了寄主信号对其转录的抑制,其具体功能有待进一步验证。与*PlEF6*基因的下调不同,分泌毒力相关蛋白基因*PlEF8*在烟粉虱3种虫态粗提物诱导下均显著上调,提示其可能参与淡紫紫孢菌侵染结构形成及致病调控。在细菌病原菌中,效应因子常通过协同作用增强毒力,如铜绿假单胞菌*Pseudomonas aeruginosa*的外毒素S(exoenzyme S,ExoS)和外毒素U(exoenzyme U,ExoU)形成"双重毒力模块"协同破坏宿主细胞(Song et al.,2023)。值得注意的是,*PlEF5*基因与*PlEF8*基因在烟粉虱雌成虫粗提物诱导下均显著上调,且均在48 h时表达水平更高,表达趋势的一致性提示二者可能存在功能协同,值得深入研究。

本研究为淡紫紫孢菌效应因子的功能解析提供了候选靶标,但存在一定的局限,如PHI数据库的物种偏倚、粗提物诱导体系无法完全模拟活体侵染的复杂信号、效应因子宿主靶标未明确等。未来需结合基因敲除、蛋白质互作及寄主靶点鉴定等手段,深入解析关键效应因子的作用机制,为靶向生防制剂开发提供理论支撑。

### 参 考 文 献 (References)

Barash S, Wang W, Shi YG. 2002. Human secretory signal peptide description by hidden Markov model and generation of a strong artificial signal peptide for secreted protein expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, 294(4): 835−842

Beys-da-Silva WO, Santi L, Berger M, Calzolari D, Passos DO, Guimarães JA, Moresco JJ, Yates JR. 2014. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. Journal of Proteome Research, 13(5): 2282−2296

Block A, Li GY, Fu ZQ, Alfano JR. 2008. Phytopathogen type III effec-

tor weaponry and their plant targets. Current Opinion in Plant Biology, 11(4): 396−403

Boldo JT, Junges A, do Amaral KB, Staats CC, Vainstein MH, Schrank A. 2009. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. Current Genetics, 55(5): 551−560

Boller T, He SY. 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. Science, 324(5928): 742−744

Bolton MD, van Esse HP, Vossen JH, de Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJE, van den Berg GCM, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, de Koster CG, et al. 2008. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. Molecular Microbiology, 69(1): 119−136

Chang XL, Wu XW, Yuan YD, Zhang TS, Gu HT, Wang DS, Wang P, Wang R. 2024. Research progress of two important virus diseases transmitted by insect vectors in tomato. Acta Agriculturae Shanghai, 40(3): 122−127 (in Chinese) [常晓丽, 武向文, 袁永达, 张天澍, 顾浩天, 王冬生, 王培, 王然. 2024. 番茄两种虫媒传播的重要病毒病研究进展. 上海农业学报, 40(3): 122−127]

Cheng Q, Cao YZ, Jiang C, Xu LA, Wang MX, Zhang SG, Huang MR. 2010. Identifying secreted proteins of *Marssonina brunnea* by degenerate PCR. Proteomics, 10(13): 2406−2417

Dong ZY, Shu YX, Chen XY, Luo M. 2019. Prediction and analysis of candidate effectors from genome of *Isaria fumosorosea*. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 28(12): 2078−2083 (in Chinese) [董章勇, 舒永馨, 陈欣瑜, 罗梅. 2019. 玫烟色棒束孢基因组候选效应因子的预测分析. 西北农业学报, 28(12): 2078−2083]

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nature Protocols, 2(4): 953−971

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. Journal of Molecular Biology, 300(4): 1005−1016

Fang WG, Leng B, Xiao YH, Jin K, Ma JC, Fan YH, Feng J, Yang XY, Zhang YJ, Pei Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. Applied and Environmental Microbiology, 71(1): 363−370

Gu KP, Wu W, Hu QB. 2022. Bioactive of soil fungi against whitefly. Journal of Environmental Entomology, 44(4): 1010−1018 (in Chinese) [古开平, 吴伟, 胡琼波. 2022. 几种土壤真菌对烟粉虱的生物活性研究. 环境昆虫学报, 44(4): 1010−1018]

Hao XH, Liu SZ. 2024. Virulence evaluation of *Paecilomyces lilacinus* and *Beauveria bassiana* against tomato *Bemisia tabaci* nymphs. Vegetables, (12): 46−51 (in Chinese) [郝轩卉, 刘守柱. 2024. 淡紫拟青霉和球孢白僵菌对番茄烟粉虱若虫的毒力评价. 蔬菜, (12): 46−51]

Huang JJ, Hu PJ, Ye LX, Shen ZH, Chen XF, Liu F, Xie YY, Yu JH, Fan X, Xiao M, et al. 2024. Pan-drug resistance and hypervirulence in a human fungal pathogen are enabled by mutagenesis induced by mammalian body temperature. Nature Microbiology, 9(7): 1686−1699

Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. Nature, 444(7117): 323−329

Jorda J, Kajava AV. 2009. T-REKS: identification of Tandem repeats in sequences with a *K*-means based algorithm. Bioinformatics, 25(20): 2632−2638

Kainat, Mujtaba M, Wang YT, Zhou BR. 2025. Effectors of plants pathogenic fungi and fungal like microbes: a comprehensive review on mechanisms, roles, and host interactions. Frontiers in Plant Science, 16: 1626960

Kavallieratos NG, Wakil W, Eleftheriadou N, Ghazanfar MU, El-Shafie H, Simmons AM, Dimase M, Smith HA, Chandler D. 2024. Integrated management system of the whitefly *Bemisia tabaci*: a review. Entomologia Generalis, 44(5): 1117−1133

Kiefer E, Heller W, Ernst D. 2000. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. Plant Molecular Biology Reporter, 18(1): 33−39

Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, Ver Loren van Themaat E, van der Does HC, Hacquard S, Stüber K, Will I, Schmalenbach W, et al. 2012. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. PLoS Pathogens, 8(4): e1002643

Kordi M, Farrokhi N, Masoudi A, Shadmehri AD, Gharanjik S. 2015. Expression analyses of some *Beauveria bassiana* genes in response to cuticles of four different insects. Journal of Crop Protection, 4(Supple.): 675−690

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. Journal of Molecular Biology, 305(3): 567−580

Liang LM, Wu H, Liu ZH, Shen RF, Gao H, Yang JK, Zhang KQ. 2013. Proteomic and transcriptional analyses of *Arthrobotrys oligospora* cell wall related proteins reveal complexity of fungal virulence against nematodes. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(19): 8683−8692

Liu Z, Liu FF, Li H, Zhang WT, Wang Q, Zhang BX, Sun YX, Rao XJ. 2022. Virulence of the bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, 115(2): 462−473

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods, 25(4): 402−408

Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. Insects, 4(3): 357−374

Pan HP, Chu D, Yan WQ, Su Q, Liu BM, Wang SL, Wu QJ, Xie W, Jiao XG, Li RM, et al. 2012. Rapid spread of tomato yellow leaf curl virus in China is aided differentially by two invasive whiteflies. PLoS ONE, 7(4): e34817

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0:

discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods, 8(10): 785−786

Ramachandran SR, Yin CT, Kud J, Tanaka K, Mahoney AK, Xiao FM, Hulbert SH. 2017. Effectors from wheat rust fungi suppress multiple plant defense responses. Phytopathology, 107(1): 75−83

Rigobelo EC, Nicodemo D, Babalola OO, Desoignies N. 2024. *Purpureocillium lilacinum* as an agent of nematode control and plant growth-promoting fungi. Agronomy, 14(6): 1225

Song YQ, Mu YQ, Wong NK, Yue Z, Li J, Yuan M, Zhu X, Hu JS, Zhang G, Wei DW, et al. 2023. Emergence of hypervirulent *Pseudomonas aeruginosa* pathotypically armed with co-expressed T3SS effectors ExoS and ExoU. hLife, 1(1): 44−56

Stergiopoulos I, de Wit PJGM. 2009. Fungal effector proteins. Annual Review of Phytopathology, 47: 233−263

Tariqjaveed M, Mateen A, Wang SZ, Qiu SS, Zheng XH, Zhang J, Bhadauria V, Sun WX. 2021. Versatile effectors of phytopathogenic fungi target host immunity. Journal of Integrative Plant Biology, 63(11): 1856−1873

Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Islas-Flores I, Canto-Canché B. 2022. Microbial effectors: key determinants in plant health and disease. Microorganisms, 10(10): 1980

Tong SM, Chen Y, Ying SH, Feng MG. 2016a. Three DUF1996 proteins localize in vacuoles and function in fungal responses to multiple stresses and metal ions. Scientific Reports, 6: 20566

Tong SM, Chen Y, Zhu J, Ying SH, Feng MG. 2016b. Subcellular localization of five singular WSC domain-containing proteins and their roles in *Beauveria bassiana* responses to stress cues and metal ions. Environmental Microbiology Reports, 8(2): 295−304

Wang G, Liu ZG, Lin RM, Li EF, Mao ZC, Ling J, Yang YH, Yin WB, Xie BY. 2016. Biosynthesis of antibiotic leucinostatins in bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* and their inhibition on *Phytophthora* revealed by genome mining. PLoS Pathogens, 12(7): e1005685

Wei S, Bian RL, Andika IB, Niu EB, Liu Q, Kondo H, Yang L, Zhou HS, Pang TX, Lian ZQ, et al. 2019. Symptomatic plant viroid infections in phytopathogenic fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(26): 13042−13050

Winnenburg R, Urban M, Beacham A, Baldwin TK, Holland S, Lindeberg M, Hansen H, Rawlings C, Hammond-Kosack KE, Köhler J. 2008. PHI-base update: additions to the pathogen host interaction database. Nucleic Acids Research, 36(Database issue): 572−576

Yang F, Jiang HY, Cai YX, Tang YL, Ma K, Shi XJ, Chang GZ, Liu JT. 2023. Advances in study on *Purpureocillium lilacinum*-biocontrol strain of vegetable root-knot nematode. China Cucurbits and Vegetables, 36(3): 1−8 (in Chinese) [杨凡, 姜华艳, 蔡毓新, 唐艳领, 马凯, 史宣杰, 常高正, 刘景堂. 2023. 蔬菜根结线虫生防菌淡紫紫孢菌研究进展. 中国瓜菜, 36(3): 1−8]

Zhai D, Lu H, Liu SY, Liu JL, Zhang WY, Wu JJ, Li JJ, Bai RE, Yan FM, Zhao CC. 2025. Fungal warriors: effects of *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* on CCYV-carrying whiteflies. Biomolecules, 15(4): 593

Zhang LH, Li PF, Wang YF, Wang SC, Guo LH. 2025. p18 encoded by *FgGMTV1* is responsible for asymptomatic infection in *Fusarium graminearum*. mBio, 16(1): e03066-24

Zhu ZW, Xiong J, Shi H, Liu YC, Yin JJ, He KW, Zhou TY, Xu LT, Zhu XB, Lu X, et al. 2023. *Magnaporthe oryzae* effector MoSPAB1 directly activates rice *Bsr-d1* expression to facilitate pathogenesis. Nature Communications, 14(1): 8399

（责任编辑：李美娟）