

腺苷酸基琥珀酸合成酶负介导罗伯茨绿僵菌致病力

王乐陈¹, 郭世悦¹, 赵雨桐¹, 董媛媛¹, 吴文婧¹, 任言¹, 郭复明², 王玉龙^{1*}

1 安徽农业大学林学与园林学院 重大林业有害生物绿色防控安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036

2 涡阳县林业发展中心, 安徽 亳州 233600

摘要: 腺苷酸基琥珀酸合成酶(adenylosuccinate synthetase, ADSS)在细胞能量代谢与信号传导等过程中具有重要作用, 但目前在昆虫病原真菌中的研究未见报道。本研究以罗伯茨绿僵菌 *Metarhizium robertsii* 中 ADSS 家族成员 MrADSS-1 为研究对象, 利用亚细胞定位分析、基因敲除、回补和过表达等方法, 系统探究了其在绿僵菌生长、抗逆和致病过程中的作用。结果表明, MrADSS-1 分布在罗伯茨绿僵菌细胞的液泡中。敲除 *MrADSS-1* 导致菌株在麦芽糖培养基中生长速率显著下降、抗紫外能力减弱, 但耐热能力增强。致病力测定结果表明, *MrADSS-1* 敲除显著提高了绿僵菌附着胞形成率和蝉翅穿透能力, 增强了对大蜡螟的毒力, 而过表达 *MrADSS-1* 菌株则致病力下降。本研究结果表明, MrADSS-1 负介导罗伯茨绿僵菌的耐热能力和致病力。

关键词: 腺苷酸基琥珀酸合成酶; 罗伯茨绿僵菌; 亚细胞定位; 逆境胁迫; 致病力

[引用本文]

王乐陈, 郭世悦, 赵雨桐, 董媛媛, 吴文婧, 任言, 郭复明, 王玉龙, 2026. 腺苷酸基琥珀酸合成酶负介导罗伯茨绿僵菌致病力. 菌物学报, 45(4): 250251

Wang LC, Guo SY, Zhao YT, Dong YY, Wu WJ, Ren Y, Guo FM, Wang YL, 2026. Adenylosuccinate synthase negatively controls *Metarhizium robertsii* pathogenicity. Mycosystema, 45(4): 250251

资助项目: 合肥市自然科学基金(202312); 安徽省大学生创新创业训练计划(S202410364133, X202410364462, X202410364493)
This work was supported by the Hefei Municipal Natural Science Foundation (202312) and the Anhui College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202410364133, X202410364462, X202410364493).

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

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

Received: 2025-08-23; Accepted: 2025-09-18

Adenylosuccinate synthase negatively controls *Metarhizium robertsii* pathogenicity

WANG Lechen¹, GUO Shiyue¹, ZHAO Yutong¹, DONG Yuanyuan¹, WU Wenjing¹, REN Yan¹, GUO Fuming², WANG Yulong^{1*}

¹ Anhui Province Key Laboratory of Green Control for Major Forestry Pests, School of Forestry and Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

² Forestry Development Center of Woyang County, Bozhou 233600, Anhui, China

Abstract: Adenylosuccinate synthetase (ADSS) plays an important role in cellular energy metabolism and signal transduction. However, ADSS had not been reported in entomopathogenic fungi. In this study, function of ADSS family protein MrADSS-1 to the growth, stress resistance and pathogenicity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* was characterized by investigating the protein subcellular localization and gene disruption, complementation and over-expression. Results showed that MrADSS-1 is exclusively localized within the vacuole. Disruption of the *MrADSS-1* resulted in marked reduction of radial growth of the fungus on maltose medium and a significant decrease in UV-B tolerance, but unexpectedly enhanced thermotolerance. Bioassays revealed that loss of MrADSS-1 led to a pronounced increase in appressorium formation and penetration efficiency through cicada wings, resulting in elevated pathogenicity toward *Galleria mellonella* larvae. Conversely, over-expression of *MrADSS-1* attenuated fungal virulence. These findings demonstrated that MrADSS-1 functions as a repressor of both thermotolerance and virulence in *M. robertsii*.

Keywords: adenylosuccinate synthase; *Metarhizium robertsii*; subcellular localization; abiotic stress; pathogenicity

昆虫病原真菌已经被开发为真菌杀虫剂广泛应用于农林害虫的生物防治(Wang & Wang 2017; Maina *et al.* 2018)。其中绿僵菌杀虫剂作为主要的一类,可侵染鞘翅目、鳞翅目、直翅目、半翅目、双翅目、膜翅目等 30 余科 200 多种昆虫,在国内外被广泛应用(Son *et al.* 2008; Vorontsova *et al.* 2018; 农向群等 2022)。绿僵菌的侵染可分为 5 个阶段:分生孢子识别并附着寄主体壁、孢子萌发并形成附着胞、穿透体壁进入昆虫血腔、定殖血腔内并杀死昆虫和穿出昆虫体壁生长并产生分生孢子(Gao *et al.* 2011; Wang & Wang 2017)。复杂的侵染过程有效避免了害虫抗药性的产生,但是同样也导致绿僵菌杀虫剂存在杀虫周期长、效率较低以及防治效果不稳定等问题,严重限制了其大规模应用(王玉龙等 2022)。深入探究绿僵菌与昆虫的互作机制,鉴定新的毒力因子有助于提升绿僵菌的应用效果。

5'-磷酸腺苷(adenosine 5'-monophosphate, AMP)在能量代谢、信号分子传导和核酸合成等

生命过程中发挥重要作用(Sharma *et al.* 2023)。腺苷酸琥珀酸合成酶(adenylosuccinate synthetase, ADSS)广泛存在于细菌、真菌、植物和动物等真核生物中,参与催化 AMP 合成途径中的首个不可逆步骤,以肌苷-5'-单磷酸(IMP)为底物,合成腺苷酸琥珀酸(Iancu *et al.* 2002; Zhu *et al.* 2023; Kano *et al.* 2024)。哺乳动物腺苷酸琥珀酸合成酶在骨骼肌中高度表达,并且与常染色体隐性遗传的远端肌病有关(Sun *et al.* 2005; Park *et al.* 2017)。在人体中,编码肌肉特异性腺苷酸琥珀酸合成酶样 1 的 *ADSSL1* 基因突变后导致一种极罕见的肌病,表现出下肢远端无力(Baskar *et al.* 2024)。在玉米 *Zea mays* 中,ADSS 的缺失导致 AMP 含量显著下降,引起碳水化合物和氨基酸代谢的紊乱,最终导致胚乳发育受损,种子淀粉和蛋白质含量降低(Zhu *et al.* 2023)。幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* ADSS 缺陷株仅在添加腺嘌呤或腺苷的培养基中才能生长,在常规营养培养基中生长严重受限(Liechti & Goldberg 2012;

Wojtys *et al.* 2024)。

ADSS 在真菌生长、代谢和致病过程中发挥重要作用。在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen 中, ADSS 催化肌苷酸与天冬氨酸转化为腺苷酸琥珀酸。ADSS 突变体表现生长缓慢、孢子萌发率低、肌苷和次黄嘌呤大量积累、细胞分裂停滞和 DNA 复制效率变低等症状,表明 ADSS 在酵母代谢与基因组稳定性调控中发挥多重作用(Tarakhovskaya *et al.* 2025)。稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 中 ADSS 在分生孢子产生和致病性等方面发挥重要作用,缺失突变体表现为腺嘌呤营养缺陷型,并且完全丧失产孢能力和致病力(Zhang *et al.* 2022)。在新生隐球菌 *Cryptococcus neoformans* 中,ADSS 敲除后导致腺嘌呤营养缺陷型和毒力完全丧失(Blundell *et al.* 2016)。然而,ADSS 在昆虫病原真菌的生长和致病等过程中作用尚不清楚。

为明确 ADSS 昆虫病原真菌与生长发育及致病中的关系,本文研究了罗伯茨绿僵菌 *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch. *et al.* MrADSS-1 (adenylosuccinate synthetase 1, ADSS-1)的亚细胞定位,并通过构建基因敲除和过表达菌株分析 MrADSS-1 在罗伯茨绿僵菌的生长、抗逆境胁迫及致病等过程中的作用,以期为基于基因编辑提高绿僵菌杀虫能力提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和虫源

罗伯茨绿僵菌 ARSEF23,保存于安徽省重大林业有害生物绿色防控重点实验室菌种库。大肠杆菌 TOP10 和根癌农杆菌 AGL-1 均购自唯地生物公司。大蜡螟 5 龄幼虫购自瑞清钓饵有限公司。

1.1.2 培养基

PDA (potato dextrose agar)培养基:葡萄糖 20 g、马铃薯 200 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL;SDAY (Sabouraud dextrose agar with yeast extract)培养基:葡萄糖 40 g、蛋白胨 10 g、酵母浸粉 10 g、琼脂粉 15 g、蒸馏水 1 000 mL;1/4 SDAY 培养基:葡萄糖 10 g、蛋白胨 2.5 g、酵母浸粉 2.5 g、琼脂粉 15 g、蒸馏水 1 000 mL;

CZA (Czapek yeast autolysate agar)培养基:磷酸氢二钾 1.0 g、硝酸钠 3.0 g、氯化钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30.0 g、琼脂粉 15 g、蒸馏水 1 000 mL;MM 液体培养基:硝酸钠 6 g、氯化钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、磷酸氢二钾 0.25 g、丙三醇 10 mL、蒸馏水 1 000 mL。

1.1.3 试剂

胶回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;TRIzol 试剂、Abclonal 重组酶、Taq DNA 聚合酶、10× PCR Buffer、dNTPs、DNA Marker 和限制性核酸内切酶均购自大连宝生物公司(大连)。

1.2 突变菌株构建

利用农杆菌介导的遗传转化方法进行目的基因敲除、回补、过表达等菌株的构建(Wang *et al.* 2021)。

MrADSS-1 敲除菌株构建:PCR 扩增 *MrADSS-1* 基因上游(895 bp)和下游(916 bp)的同源臂(表 1)。利用一步克隆法,将上、下游片段分别连接到草铵膦抗性的双元载体 pDht-SK-bar 上,获得敲除质粒 pDht-SK-bar-MrADSS-1。将构建好的敲除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获得敲除菌株。

MrADSS-1 回补菌株构建:PCR 扩增获得包括 *MrADSS-1* 基因上游(1 408 bp),全长编码序列(231 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-MrADSS-1 (表 1)。将构建好的质粒转入根癌农杆菌 AGL-1,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获得回补菌株。

MrADSS-1 过表达菌株构建:PCR 扩增获得 *MrADSS-1* 全长编码序列(231 bp),连接到含巢巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子的双元载体 pDht-gpdA-bar 上,获得过表达质粒 pDht-gpdA-bar-MrADSS-1 (表 1)。将构建好的质粒通过根癌农杆菌 AGL-1 介导的转化方法转入绿僵菌野生菌株获得过表达菌株。

MrADSS-1 荧光标记菌株构建:PCR 扩增获得 *MrADSS-1* 全长编码序列(231 bp)的片段,连接到含绿色荧光蛋白(GFP)的双元载体 pDht-GFP-

表 1 研究中采用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer		序列 Sequence (5'→3')
基因敲除载体构建引物 Primers required for gene-knockout vector construction	<i>ΔMrADSS-1-up-F</i> <i>ΔMrADSS-1-up-R</i> <i>ΔMrADSS-1-down-F</i> <i>ΔMrADSS-1-down-R</i>	TTTCCTCGTGTATCCCCGGGGGAGTTTGCTCGTGCGTCTTG CTTTTTCCCACCCGCCGAGCTGCAGCCCGGGGATCCGTC ATCTGATGAAGTAGTTCTAGAGCATTGGCCTCTATTCTTTT TGCCTCGACAGGTGGTGCAGGCCGGCCTTGCTCGCCGAGT
基因回补载体构建引物 Primers for complementation vector construction	<i>cpΔMrADSS-1-p-F</i> <i>cpΔMrADSS-1-p-R</i>	CAAGCTTCGCACTAGTTCTAGAGAACACTATGCGGTGAAGG CGAGATCGGGGCGTTTCATTCGGGAGACGAAATAAACTA
荧光标记载体构建引物 Primers for constructing fluorescence-labeled vectors	<i>MrADSS-1-Gfp-F</i> <i>MrADSS-1-Gfp-R</i>	ACTTTGAAGACTGTGGTCTTATGATGGTGAGCAAGGGCGAG CATCTACTCTGCAGGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
基因过表达载体构建引物 Primers required for construction of gene over-expression vector	<i>MrADSS-1^{OE}-F</i> <i>MrADSS-1^{OE}-R</i>	CAAGAACCTTTAATCGAATTCATGAACGCCCGATCTCG TGTAGTCCATAAGACCACAGTCTTCAAAGTCGC
突变株验证引物 Primers required for validation of mutants	<i>Bar-F</i> <i>Bar-R</i> <i>MrADSS-1-F</i> <i>MrADSS-1-R</i> <i>Ben-F</i> <i>Ben-R</i>	GCACCATCGTCAACCACTAC CAAGCTGCTCTAGCATTCCG CAGTCGTCGCAGCCTGTCCCCATG GGTTGACATCCCGAAGAAAAGTCTCG CGTTACCTCACCTGCTCTG CCTCACTAAAGGGAACAAAA

ben 上, 获得荧光标记质粒 pDHt-GFP-ben-MrADSS-1 (表 1)。将构建好的质粒通过根瘤农杆菌 AGL-1 介导的转化方法转入基因敲除突变体获得荧光标记菌株。

提取转化菌株的 DNA 和 RNA, 利用 PCR 或者反转录 PCR 进行验证。

1.3 亚细胞定位

将 MrADSS-1 荧光标记菌株培养于 PDA 培养基, 收集 4 d 的孢子、菌丝。使用液泡染色剂 7-氨基-4-氯甲基香豆素对孢子和菌丝进行染色, 终浓度为 10 μmol/L。

1.4 生物学性状测定

罗伯茨绿僵菌孢悬液制备: 将 PDA 培养基上培养 14 d 的罗伯茨绿僵菌分生孢子收集至 1 mL 0.05% Tween-80 水中, 涡旋振荡 2–5 min, 使孢子完全分散。利用脱脂棉过滤除去菌丝, 获得分生孢子悬浮液, 利用血球计数板计数孢子浓度。

营养生长测定: 吸取 1 μL 浓度为 1×10^7 conidia/mL 的孢子悬浮液分别点接至 PDA、SDAY、1/4 SDAY 培养基中央, 25 °C 恒温培养箱内培养 14 d, 使用十字交叉法测量菌落直径。

产孢量测定: 吸取 30 μL 浓度为 5×10^6 conidia/mL 的孢子悬浮液均匀涂布于 60 mm

的 PDA 培养基上, 25 °C 恒温培养箱, 刮取培养 7 d 和 14 d 平板上的所有孢子于 30 mL 的 0.05% Tween-80 中, 涡旋 15 min 后, 显微镜下使用血球计数板计数孢子浓度。

不同碳、氮源培养基上生长测定: 吸取 1 μL 浓度为 1×10^7 conidia/mL 的孢悬液点接至 CZA 及改良型 CZA 培养基中央, 25 °C 恒温培养箱内培养 14 d, 使用十字交叉法测量菌落直径。

化学试剂耐受力测定: 吸取 1 μL 浓度为 1×10^7 conidia/mL 的孢悬液点接至添加化学试剂的 PDA 培养基(2 mg/mL congo red 或 10 mmol/L H₂O₂ 或 0.5 mol/L NaCl)中央, 25 °C 恒温培养箱内培养 14 d, 使用十字交叉法测量菌落直径。

相对生长抑制率=(WT 菌株在 PDA 培养基上生长直径-敲除菌株在添加化学试剂的 PDA 培养基上生长直径)/WT 菌株在 PDA 培养基上生长直径×100%。

热耐受力的测定: 将浓度为 5×10^6 conidia/mL 的孢子悬浮液于 42 °C 水浴 1 h, 对照为室温放置 1 h 的孢子悬浮液, 吸取 10 μL 的孢子悬浮液点接至 PDA 培养基上, 25 °C 恒温培养 16 h 和 24 h, 显微镜下观察萌发情况并计数。相对萌发率=(处理组萌发率/对照组萌发率)×100%。

紫外耐受力的测定: 吸取 10 μL 浓度为 $5 \times$

10^6 conidia/mL 的孢子悬浮液点接至 PDA 培养基上, 吹干后放置于紫外交联仪中 90 J/cm^2 照射 10 s, 25°C 恒温培养 16 h 和 24 h, 显微镜下观察培养后菌株的孢子萌发情况并计数。相对萌发率=(处理组萌发率/对照组萌发率) $\times 100\%$ 。

蝉翅穿透能力测定: 吸取 $1 \mu\text{L}$ 浓度为 1×10^7 conidia/mL 的孢子悬浮液点接至贴有蝉翅的 PDA 培养基上, 25°C 培养 3 d 后揭去蝉翅, 再生长 7 d 后用十字交叉法测量直径。

附着胞形成能力测定: 用 MM 液体培养基重悬配制成浓度为 1×10^6 conidia/mL 的孢子悬浮液, 吸取 1 mL 到 35 mm 的疏水皿中, 25°C 恒温培养箱内培养 24 h, 显微镜下观察并计算附着胞形成率。

以上试验均设置 3 次生物学重复。

1.5 昆虫生物测定

体内注射法: 取 $10 \mu\text{L}$ 孢子悬浮液(1×10^5 conidia/mL)注射进大蜡螟第二腹足中, 注射无菌水作为对照。将注射后的幼虫放置于铺好无菌滤纸的 90 mm 玻璃皿内, 25°C 恒温培养箱内培养, 每隔 12 h 统计大蜡螟死亡数据, 直至所有试虫死亡。体壁侵染法: 将大蜡螟置于 30 mL 孢子悬浮液(1×10^7 conidia/mL)的离心管中, 浸渍 60 s 后取出, 放于 90 mm 玻璃皿内, 加入棉球保湿, 25°C 恒温培养箱内培养, 每隔 12 h 统计大蜡螟死亡数据, 直至所有试虫死亡。每个处理 30 只幼虫, 试验重复 3 次。

1.6 *MrADSS-1* 基因过表达菌株荧光定量 PCR 检测

野生型菌株和 *MrADSS-1* 基因过表达菌株在 PDA 培养基上培养 14 d, 收集真菌。采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 利用浓度 1% 凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 使用分光光度计及生物分析仪系统检测 RNA 的纯度及浓度。荧光定量

PCR 反应体系: $12.5 \mu\text{L}$ $2 \times \text{SYBR}^{\text{®}}$ Ex Premix *Taq*TM II、正反向引物各 $1 \mu\text{L}$ 、DNA 模板 $2 \mu\text{L}$ 、双蒸水 $8.5 \mu\text{L}$ 。扩增程序: 95°C 预变性 10 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s, 循环 40 次; 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 1 min、 95°C 变性 15 s。以甘油酸-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GPDH)为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析不同基因的相对表达量。每组试验重复 3 次。

1.7 数据分析

使用 GraphPad Prism 8.3 软件对数据进行统计分析, 并生成图表; 使用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计学显著性分析, 具体方法为: 首先进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 当 ANOVA 结果存在显著差异时, 进一步采用 Tukey's honestly significant difference (HSD) 检验进行组间多重比较。

2 结果与分析

2.1 *MrADSS-1* 的亚细胞定位

7-氨基-4-氯甲基香豆素染色剂与液泡内的硫醇反应, 呈现蓝色, 实现对液泡的特异性染色。亚细胞定位显示, 绿色荧光蛋白标记 *MrADSS-1* 蛋白的荧光信号与液泡特异性染料 CMAC 信号重叠(图 1)。

2.2 *MrADSS-1* 的敲除影响罗伯茨绿僵菌的营养生长

分别在 PDA、SDAY、1/4 SDAY 这 3 种培养基上进行营养生长测定, 敲除菌株 $\Delta\text{MrADSS-1}$ 的菌落形态和生长直径与野生型菌株 WT 和回补菌株 $\text{cp}\Delta\text{MrADSS-1}$ 无显著性差异(图 2A, 2B)。测定 PDA 培养基上生长 14 d 的菌株孢子数量, $\Delta\text{MrADSS-1}$ 与 WT 和 $\text{cp}\Delta\text{MrADSS-1}$ 的产孢量无

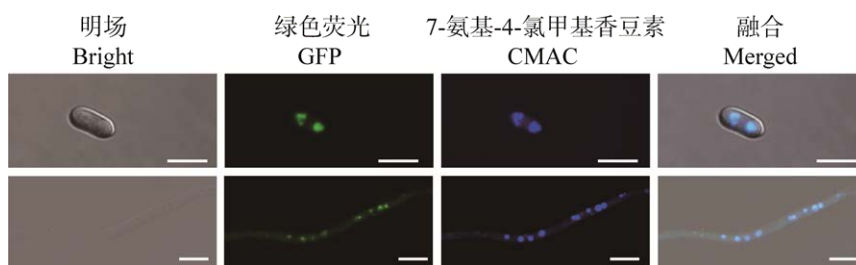


图 1 *MrADSS-1* 的亚细胞定位 标尺=10 μm

Fig. 1 Subcellular localization of *MrADSS-1*. Bars=10 μm .

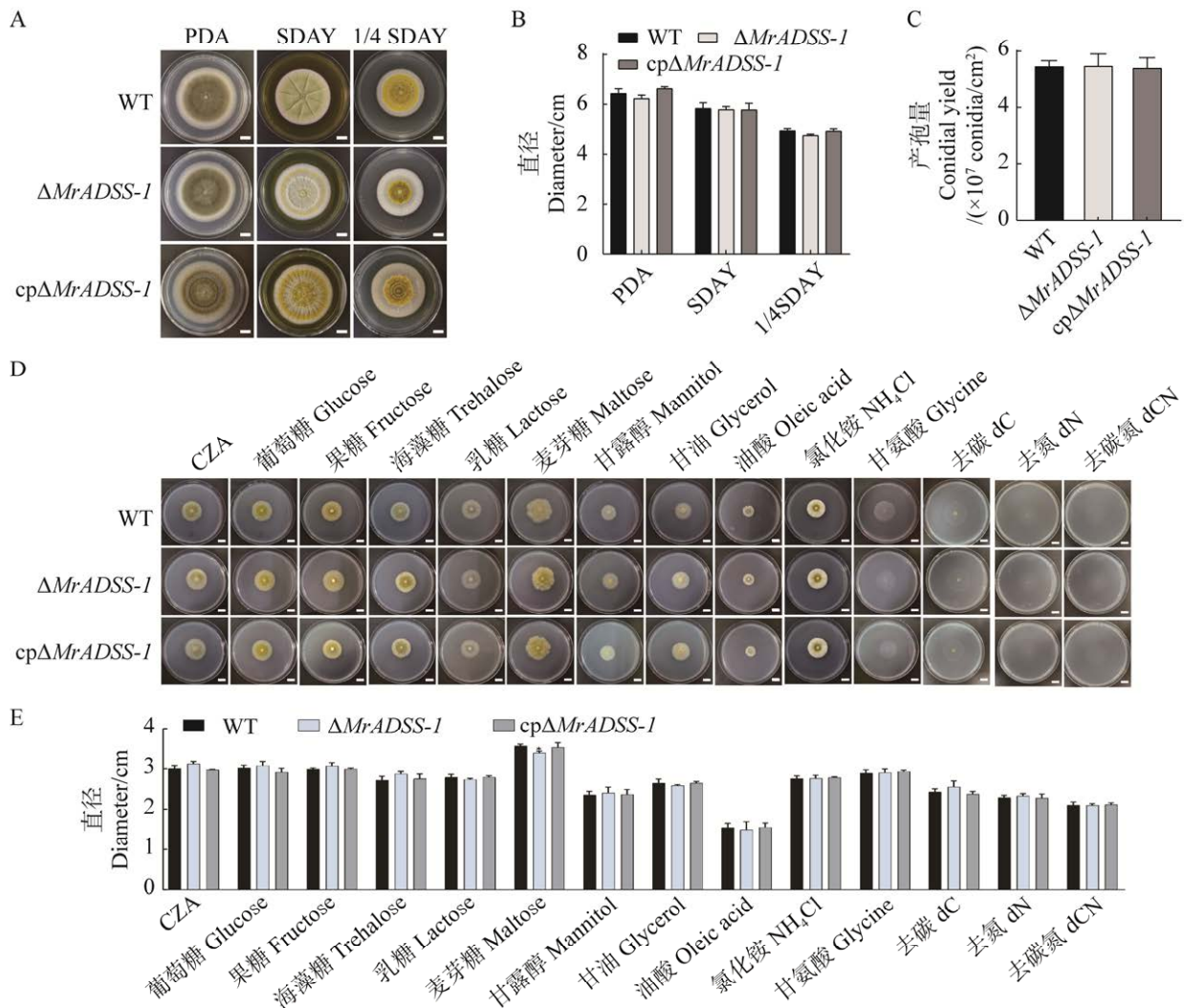


图 2 敲除 *MrADSS-1* 对罗伯茨绿僵菌生长的影响 A, B: 突变株在 PDA、SDAY、1/4 SDAY 培养基上生长的菌落形态 (A)和生长直径(B); C: 突变株在 PDA 培养基上的产孢量; D, E: 突变株在 CZA 及改良型 CZA 培养基上生长的菌落形态和生长直径; 图中数据为平均数 \pm 标准误差; 标尺=1 cm; * $P<0.05$

Fig. 2 The effect of *MrADSS-1* knockout on the asexual growth of *Metarhizium robertsii*. A, B: Colony morphology and diameter of the mutant strains on PDA, SDAY, and 1/4 SDAY media. C: Conidiation of the mutant strains on PDA medium. D, E: Colony morphology and diameter of the mutant strains on CZA and modified CZA media. Data are mean \pm SE. Bars=1 cm. * $P<0.05$.

显著性差异($P>0.05$, 图 2C)。

为明确 *MrADSS-1* 敲除对罗伯茨绿僵菌在不同碳、氮源培养基生长性状的影响, 在 CZA 和替换碳、氮源的不同改良型 CZA 培养基上测定不同菌株菌落生长直径。当培养基中的碳源为麦芽糖时, 与 WT [(3.59 \pm 0.04) cm]和 $cp\Delta MrADSS-1$ [(3.55 \pm 0.12) cm]相比, $\Delta MrADSS-1$ [(3.41 \pm 0.04) cm]的菌落生长直径显著减少($P<0.05$), 而在 CZA 和其他改良型 CZA 培养基上, $\Delta MrADSS-1$ 与 WT 和 $cp\Delta MrADSS-1$ 生长的菌落形态和生长直

径无显著性差异($P>0.05$) (图 2D, 2E)。由此表明, *MrADSS-1* 基因缺失影响罗伯茨绿僵菌利用麦芽糖的能力。

2.3 敲除 *MrADSS-1* 影响罗伯茨绿僵菌对热和紫外的耐受力

为明确 *MrADSS-1* 的敲除对罗伯茨绿僵菌胁迫环境耐受能力的影响, 在 PDA 培养基中分别添加 NaCl (高渗胁迫)、H₂O₂ (氧化胁迫)和 congo red (细胞壁胁迫), 检测不同菌株的菌落生长特征。与 WT 和 $cp\Delta MrADSS-1$ 相比, $\Delta MrADSS-1$

的生长直径无显著性差异($P>0.05$, 图 3A, 3B); 在热激胁迫实验中, 在热处理后 16 h 或者 24 h, $\Delta MrADSS-1$ 分生孢子相对萌发率都显著高于 WT 和 $cp\Delta MrADSS-1$ ($P<0.01$, 图 3C); 而在紫外辐射胁迫后 16 h 或者 24 h 时, $\Delta MrADSS-1$ 孢子相对萌发率都显著低于 WT 和 $cp\Delta MrADSS-1$ ($P<0.05$, 图 3D), 尤其在 24 h 时, $MrADSS-1$ 的敲除使得紫外辐射胁迫后罗伯茨绿僵菌孢子相对萌发率下降 29.8%。

2.4 敲除 $MrADSS-1$ 后显著提高罗伯茨绿僵菌的穿透能力

蝉翅穿透实验证明, WT、 $\Delta MrADSS-1$ 和 $cp\Delta MrADSS-1$ 菌株均能成功穿过蝉翅, 并在去除蝉翅后的 PDA 培养基上形成了菌落(图 4A), 且 $\Delta MrADSS-1$ [(3.70±0.05) cm] 在 PDA 培养基上生长的菌落直径显著大于 WT [(3.59±0.04) cm] 和 $cp\Delta MrADSS-1$ [(3.54±0.07) cm] ($P<0.01$, 图 4B)。

在疏水皿诱导 24 h 观察附着胞形成情况, 结果显示, WT、 $\Delta MrADSS-1$ 和 $cp\Delta MrADSS-1$ 附着胞形成率分别为(66.40±1.85)%、(78.05±0.92)%和(65.07±2.77)%。与 WT 相比, $\Delta MrADSS-1$ 的附着胞形成率提高 11.64% (图 4C)。以上结果表明, $MrADSS-1$ 敲除提高罗伯茨绿僵菌的蝉翅穿透和附着胞形成的能力。

2.5 $MrADSS-1$ 负介导罗伯茨绿僵菌的毒力

昆虫生物测定结果表明, 敲除 $MrADSS-1$ 引起菌株毒力显著提高。体内注射生物测定显示, WT、 $\Delta MrADSS-1$ 和 $cp\Delta MrADSS-1$ 侵染大蜡螟的半致死时间(LT₅₀)分别为(3.26±0.05)、(3.42±0.06)和(3.41±0.04) d, 三者之间无显著性差异, 表明敲除 $MrADSS-1$ 对罗伯茨绿僵菌的大蜡螟血腔侵染能力影响不显著(图 5A)。而体表浸渍生物测定显示, 与 WT 相比[(5.28±0.06) d], 感染 $\Delta MrADSS-1$ [(4.83±0.18) d]菌株的大蜡螟的

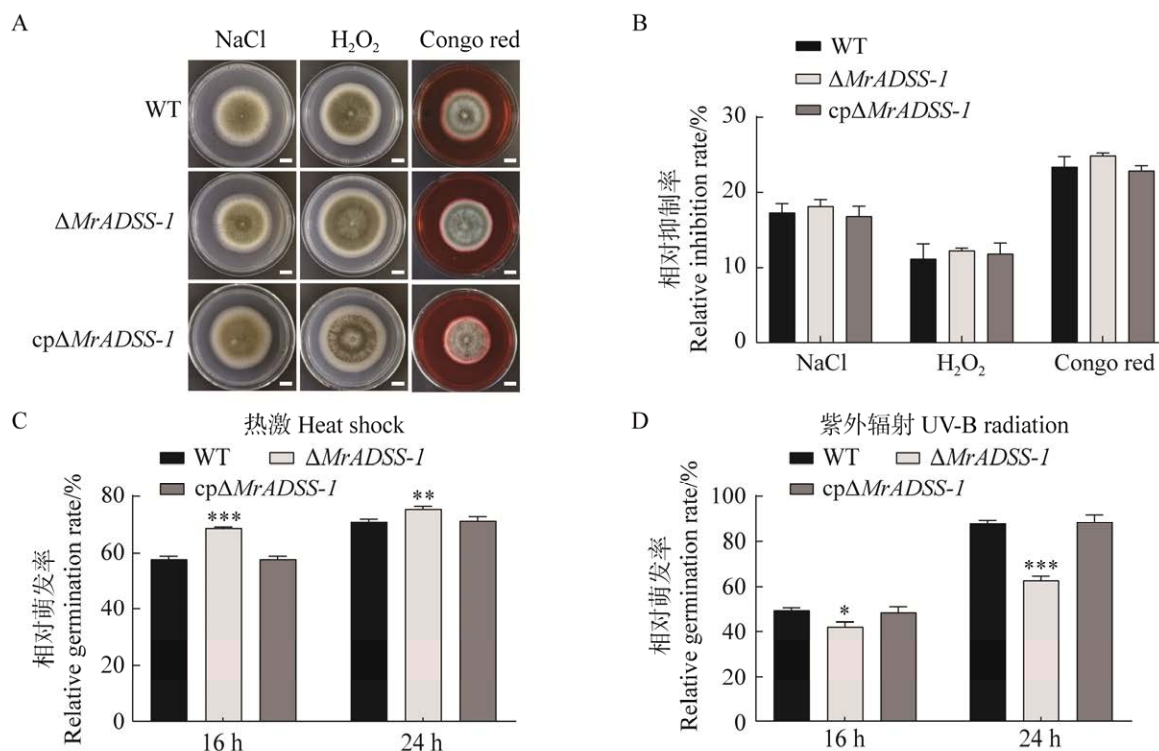


图 3 敲除 $MrADSS-1$ 对罗伯茨绿僵菌抗胁迫能力的影响 A, B: 突变株在添加 NaCl (0.5 mol/L)、H₂O₂ (10 mmol/L) 和 congo red (2 mg/mL) 的 PDA 培养基上生长的菌落形态; C: 热激后突变株的孢子相对萌发率; D: 紫外辐射后突变菌的孢子相对萌发率; 图中数据为平均数±标准误; 标尺=1 cm; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Fig. 3 The effect of $MrADSS-1$ knockout on the stress resistance of *Metarhizium robertsii*. A, B: Colony morphology and diameter of the mutant strains on PDA medium supplemented with NaCl (0.5 mol/L), H₂O₂ (10 mmol/L), or congo red (2 mg/mL). C: Relative germination rate of mutant spores after heat shock. D: Relative germination rate of mutant spores after UV irradiation. Data are mean±SE. Scale bars=1 cm. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

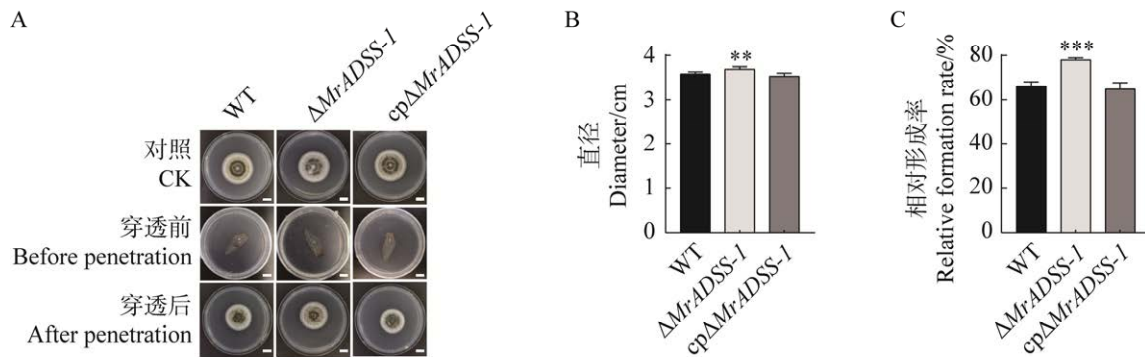


图 4 敲除 *MrADSS-1* 对罗伯茨绿僵菌穿透及附着孢形成的影响 A: 突变株穿透蝉翅后的菌落形态; B: 突变株穿透蝉翅后的菌落生长直径; C: 附着孢形成率; 图中数据为平均数±标准误; 标尺=1 cm; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Fig. 4 The effect of *MrADSS-1* deletion on the penetration and appressorium formation of *Metarhizium robertsii*. A: Colony morphology of the mutant strains after penetrating cicada wings. B: Colony diameters of the mutant strains after penetrating cicada wings. C: Appressorium formation rates. Data are mean±SE. Scale bars=1 cm. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

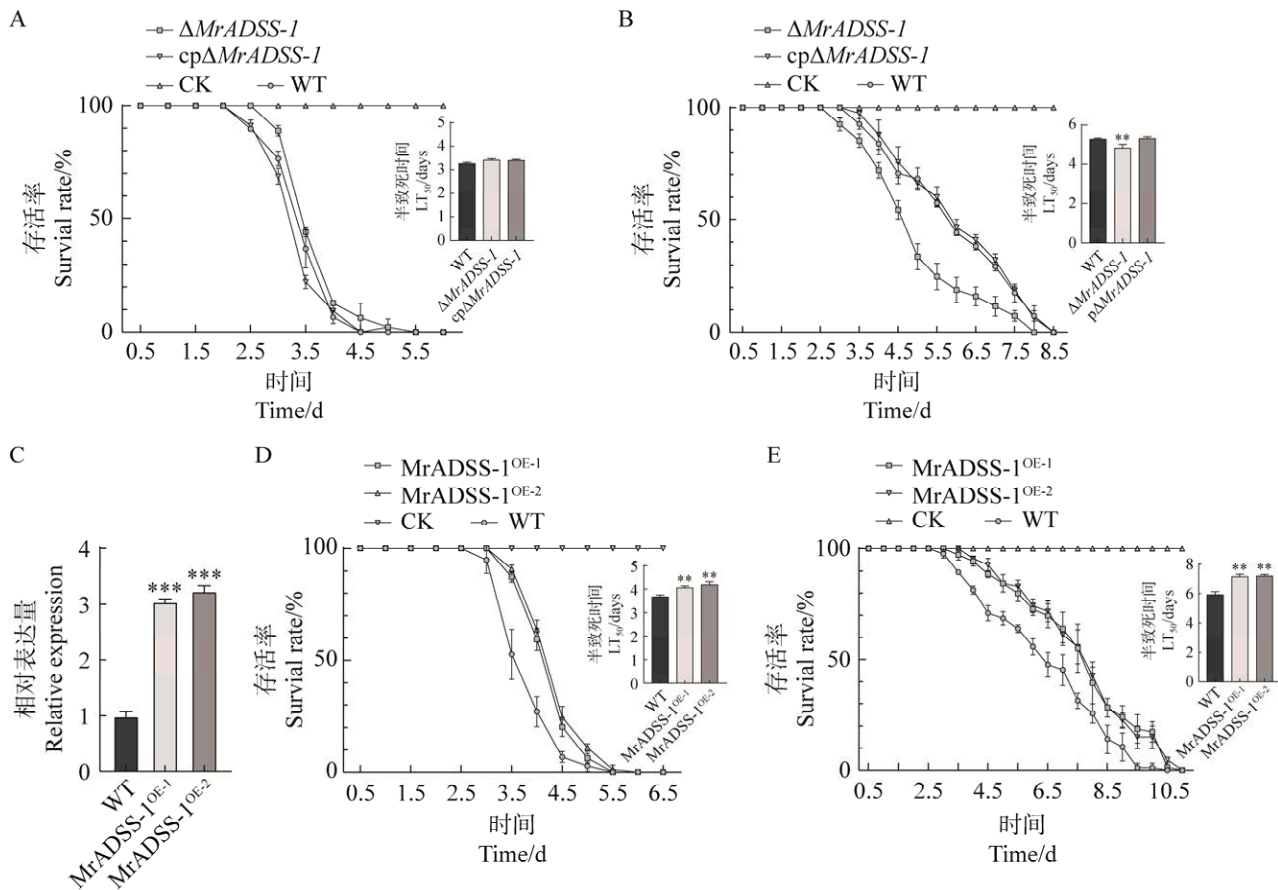


图 5 敲除及过表达 *MrADSS-1* 对罗伯茨绿僵菌致病力的影响 A, B: 敲除 *MrADSS-1* 对罗伯茨绿僵菌体内注射(A)和体表浸渍(B)致病力影响; C: *MrADSS-1*^{OE-1} 和 *MrADSS-1*^{OE-2} 的荧光定量 PCR 分析; D, E: 过表达 *MrADSS-1* 对罗伯茨绿僵菌体内注射(D)和体表浸渍(E)致病力影响; 图中数据为平均数±标准误; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Fig. 5 The effect of *MrADSS-1* deletion and over-expression on the pathogenicity of *Metarhizium robertsii*. A, B: The effect of *MrADSS-1* knockout on the pathogenicity of *M. robertsii* toward *Galleria mellonella* larvae injected and soaked by the pathogen. C: Quantitative PCR analysis of *MrADSS-1*^{OE-1} and *MrADSS-1*^{OE-2}. D, E: The effect of *MrADSS-1* overexpression on the pathogenicity of *M. robertsii* toward *Galleria mellonella* larvae injected and soaked by the pathogen. Data are mean±SE. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

LT₅₀显著降低约 0.5 d, 表明敲除 *MrADSS-1* 显著提高罗伯茨绿僵菌体表侵染的能力($P < 0.01$, 图 5B)。

为进一步明确 *MrADSS-1* 对罗伯茨绿僵菌致病力的负调控作用, 构建了 *MrADSS-1* 过表达菌株(*MrADSS-1*^{OE-1} 和 *MrADSS-1*^{OE-2}), 并对其致病力进行了测定。荧光定量 PCR 检测证实, 相较于野生型, *MrADSS-1*^{OE-1} 和 *MrADSS-1*^{OE-2} 中 *MrADSS-1* 表达量提高 2.9–3.1 倍(图 5C)。生物测定显示, 无论体内注射还是体表浸渍, 过表达 *MrADSS-1* 显著降低罗伯茨绿僵菌的致病力(图 5D, 5E)。其中, 与 WT 相比, 体内注射 *MrADSS-1*^{OE-1} 和 *MrADSS-1*^{OE-2} 侵染的大蜡螟 LT₅₀ 分别延长 0.4 d 和 0.51 d (图 5D), 体表浸渍 *MrADSS-1*^{OE-1} 和 *MrADSS-1*^{OE-2} 侵染的大蜡螟 LT₅₀ 分别延长 1.23 d 和 1.26 d (图 5E)。结果表明, *MrADSS-1* 参与罗伯茨绿僵菌的毒力调控。

3 讨论

AMP 广泛存在于真核与原核生物中, 对于维持生命体的细胞活动和生长代谢发挥重要作用(Honzatko & Fromm 1999)。作为 AMP 合成的限速酶, ADSS 通过调控 AMP/ADP/ATP 的代谢平衡, 在细胞能量稳态维持中发挥核心作用(Zhu *et al.* 2023)。ADSS 在动物、植物和微生物等不同物种中的功能具有一定的保守性(Zhu *et al.* 2023)。本研究通过对昆虫病原真菌模式生物——罗伯茨绿僵菌中 ADSS 进行研究, 表明 ADSS 在绿僵菌的抗紫外、抗热激和致病等过程中发挥重要作用。

尽管 ADSS 广泛存在, 但是在不同物种中的结构存在显著差异, 可分为不同家族类群, 且不同类群间功能同样存在差异(Mišković *et al.* 2024)。研究表明, ADSS 的开关环区域从开放构象转变为闭合构象有助于 GTP 在活性位点的紧密堆积, 促使 ADSS 更好发挥 AMP 合成代谢功能(Iancu *et al.* 2002)。与大肠杆菌 *Escherichia coli* 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等物种 ADSS 结构相比, 杜氏利什曼原虫 *Leishmania donovani* ADSS 的开关环功能区域具有更多的氨基酸位

点变异性, 致使 ADSS 与 ADP 结合后, 其开关环构象仍然部分开放, 表明其在腺嘌呤的紧密堆积方面存在不足(Mochi *et al.* 2024)。因此, 杜氏利什曼原虫 ADSS 在功能上表现出差异性, 负责嘌呤补救途径中的腺苷琥珀酸合成, 在寄生虫的生长、代谢和感染能力方面起关键作用(Boitz *et al.* 2013)。而在玉米中, ADSS 分布于细胞质体中, 对种子发育和养分积累至关重要, 其缺失会导致 AMP 含量降低, 碳水化合物和氨基酸代谢紊乱(Zhu *et al.* 2023)。在酿酒酵母中, ADSS 突变体表现出生长缓慢、孢子萌发不良、肌苷和次黄嘌呤大量积累(Tarakhovskaya *et al.* 2025)。在本研究中, 敲除 *MrADSS-1* 后对于罗伯茨绿僵菌的营养生长、产孢并没有显著影响, 但是致病能力发生显著变化。进一步对不同物种 ADSS 的亚细胞定位分析发现, 玉米中的 ADSS 分布于细胞质体中; 在盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum* 中, ADSS 定位于细胞质中(Wiesmuller *et al.* 1991); 细脚拟青霉 *Paecilomyces tenuipes* 中 ADSS 分布于细胞质中, 在腺苷产生过程中可能发挥重要作用(杜林娜等 2018); 而本研究中, *MrADSS-1* 荧光信号与液泡特异性染料 CMAC 信号重叠, 表明不同物种间 ADSS 的结构、亚细胞定位和功能等方面具有显著差异。

在稻瘟病菌中, ADSS 参与腺苷酸从头合成途径, ADSS 的缺失导致稻瘟病菌无法产生分生孢子、对刚果红和氧化剂等化合物的敏感性增加、子囊壳形成数量减少、致病性显著降低(Zhang *et al.* 2022)。在新生隐球菌中, 降低 ADSS 的表达导致真菌表现出腺嘌呤营养缺陷, 且致病能力完全丧失(Blundell *et al.* 2016)。本研究中, 敲除 *MrADSS-1* 的罗伯茨绿僵菌产孢能力、对刚果红和氧化剂等化合物的敏感性等性状与亲本菌株无明显差异, 但穿透昆虫体壁能力和致病力显著升高, 表明侵染寄主的差异致使 ADSS 在不同病原真菌中的功能发生改变, 以更好适应进化的需要。

研究表明, 罗伯茨绿僵菌存在单胺氧化酶(MAO), 能够催化色胺分解为无毒代谢产物,

致使色胺在宿主体内的积累速率下降，从而降低色胺对蝗虫的毒性。敲除 *MAO* 后绿僵菌的致病能力显著提高(Tong *et al.* 2020)。ADSS 参与生物 AMP 的合成，而 AMP 在病原真菌的致病过程中发挥重要作用(Sun *et al.* 2024)。本研究中，敲除 *MrADSS-1* 后罗伯茨绿僵菌致病力显著升高，过表达 *MrADSS-1* 能够显著降低致病力，明确了 *MrADSS-1* 负介导绿僵菌的致病力。但是，*MrADSS-1* 如何介导 AMP 的合成参与绿僵菌致病的作用机制，尚需要进一步的研究。

基因编辑技术已广泛应用于农业、医学、生产及科学研究等领域，其在“精准度和高效性”等方面的优势为提高昆虫病原真菌致病能力开辟了新路径(霍贯中等 2025)。当前，基于 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术可实现对绿僵菌和白僵菌等昆虫病原真菌的基因靶向改造，提升真菌的耐高温、耐紫外辐射、黏附和致病等能力(Mascarin *et al.* 2024)。本研究中，敲除 *MrADSS-1* 后罗伯茨绿僵菌致病力显著升高，证实 *MrADSS-1* 负调控绿僵菌致病力，为将来基于基因编辑技术改造绿僵菌致病能力提供了靶标基因。

作者贡献

王乐陈：基因敲除、过表达和回补菌株的构建与验证；郭世悦：生物学性状检测与分析；赵雨桐：功能基因的亚细胞定位分析；董媛媛和吴文婧：突变菌株的致病力分析；任言：菌株的保存、试虫的饲养；郭复明：实验思路指导、论文审阅与修订；王玉龙：试验整体设计、研究监管与指导、论文审阅与修订。

利益冲突声明

该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

Baskar D, Polavarapu K, Preethish-Kumar V, Vengalil S, Nashi S, Töpf A, Thomas A, Sanka SB, Menon D, Srivastava K, Arunachal G, Nandeesh BN, Lochmüller H,

Nalini A, 2024. Childhood-onset myopathy with preserved ambulation caused by a recurrent ADSSL1 missense variant. *Neurology Genetics*, 10(1): e200122

Blundell RD, Williams SJ, Arras SD, Chitty JL, Blake KL, Ericsson DJ, Tibrewal N, Rohr J, Koh YQ, Kappler U, Robertson AA, Butler MS, Cooper MA, Kobe B, Fraser JA, 2016. Disruption of *de novo* adenosine triphosphate (ATP) biosynthesis abolishes virulence in *Cryptococcus neoformans*. *ACS Infectious Diseases*, 2(9): 651-663

Boitz JM, Strasser R, Yates PA, Jardim A, Ullman B, 2013. Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase deficiencies trigger growth and infectivity deficits in *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13): 8977-8990

Du LN, Li XL, Wei DX, Chen HB, Yao Y, Yang J, 2018. Cloning and expression analysis of *Ptadss* gene from *Paecilomyces tenuipes*. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2018(6): 11-16 (in Chinese)

Gao Q, Jin K, Ying SH *et al.* (more than 20 authors), 2011. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*, 7(1): e1001264

Honzatko RB, Fromm HJ, 1999. Structure-function studies of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 370(1): 1-8

Huo GZ, Zhang XR, Tian SJ, Li J, 2025. Current progress and applications of CRISPR/Cas12a gene editing technology in plants. *Biotechnology Bulletin*, 41(6): 1-11 (in Chinese)

Iancu CV, Borza T, Fromm HJ, Honzatko RB, 2002. Feedback inhibition and product complexes of recombinant mouse muscle adenylosuccinate synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(43): 40536-40543

Kano T, Ishikawa K, Furuta K, Chikara K, 2024. Knockout of adenylosuccinate synthase *purA* increases susceptibility to colistin in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 371: fnae007

Liechti G, Goldberg JB, 2012. Relies primarily on the purine salvage pathway for purine nucleotide biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 194(4): 839-854

Maina UM, Galadima IG, Gambo FM, Zakaria D, 2018. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1): 27-32

Mascarin GM, Shrestha S, de Carvalho Barros Cortes MV, Ramirez JL, Dunlap CA, Coleman JJ, 2024. CRISPR-Cas9-mediated enhancement of *Beauveria bassiana* virulence with overproduction of oosporein. *Fungal Biology and Biotechnology*, 11(1): 21-21

Mišković MZ, Wojtyś M, Winiewska-Szajewska M, Wielgus-Kutrowska B, Matković M, Domazet Jurašin D,

- Štefanić Z, Bzowska A, Leščić Ašler I, 2024. Location is everything: influence of his-tag fusion site on properties of adenylosuccinate synthetase from *Helicobacter pylori*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14): 7613
- Mochi JA, Jani J, Tak K, Pappachan A, 2024. Insights into the ATP/GTP selectivity of a GTPase, adenylosuccinate synthetase from *Leishmania donovani*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 715: 149975
- Nong XQ, Wang CN, Liu R, Zhang ZH, 2022. Multiple association of *Metarhizium* with plants and the application potential in plant protection. *Journal of Plant Protection*, 48(3): 22-30 (in Chinese)
- Park HJ, Shin HY, Kim S, Kim SH, Lee Y, Lee JH, Hong JM, Kim SM, Park KD, Choi BO, Lee Ji, Choi YC, 2017. Distal myopathy with ADSSL1 mutations in Korean patients. *Neuromuscular Disorders*, 27(5): 465-472
- Sharma A, Anand SK, Singh N, Dwivedi UN, Kakkar P, 2023. AMP-activated protein kinase: an energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis. *Experimental Cell Research*, 428(1): 113614
- Son TG, Kim SJ, Kim K, Kim MS, Chung HY, Lee J, 2008. Cytoprotective roles of senescence marker protein 30 against intracellular calcium elevation and oxidative stress. *Archives of Pharmacal Research*, 31(7): 872-877
- Sun HY, Li N, Wang XJ, Chen TY, Shi LY, Zhang LH, Wang JL, Wan T, Cao XT, 2005. Molecular cloning and characterization of a novel muscle adenylosuccinate synthetase, AdSSL1, from human bone marrow stromal cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 269(1-2): 85-94
- Sun M, Dai P, Cao Z, Dong J, 2024. Purine metabolism in plant pathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 15: 1352354
- Tarakhovskaya ER, Andreychuk YV, Bilova TE, Wiesner C, Pavlov YI, Stepchenkova EI, 2025. Vulnerable nucleotide pools and genomic instability in yeast strains with deletion of the *ADE12* gene encoding for adenylosuccinate synthetase. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(8): 3458
- Tong X, Wang Y, Yang P, Wang C, Kang L, 2020. Tryptamine accumulation caused by deletion of MrMao-1 in *Metarhizium* genome significantly enhances insecticidal virulence. *PLoS Genetics*, 16(4): e1008675
- Vorontsova YL, Slepneva IA, Alekseev AA, Kryukov VY, Tyurin MV, Glupov VV, 2018. The effect of entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* of different virulence on the generation of reactive oxygen species in larvae. *Invertebrate Survival Journal*, 15: 276-284
- Wang CS, Wang SB, 2017. Insect pathogenic fungi: genomics, molecular interactions, and genetic improvements. *Annual Review of Entomology*, 62: 73-90
- Wang YL, Liu Z, Liu SH, Wang X, Li XY, Lu CL, Li XJ, Huang B, 2022. Sporulation, pathogenicity and transcriptomic analysis of entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* growing on the surface of mycosed insect cadavers. *Journal of Plant Protection*, 49(4): 1241-1251 (in Chinese)
- Wang YL, Xie XY, Qin L, Yu D, Wang ZX, Huang B, 2021. Integration of dsRNA against host immune response genes augments the virulence of transgenic *Metarhizium robertsii* strains in insect pest species. *Microbial Biotechnology*, 14(4): 1433-1444
- Wiesmuller L, Wittbrodt J, Noegel AA, Schleicher M, 1991. Purification and cDNA-derived sequence of adenylosuccinate synthetase from *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(4): 2480-2485
- Wojtys MI, Maksymiuk W, Narczyk M, Bubic A, Asler IL, Krzyzek P, Gosciniak G, Jagusztyn-Krynicka EK, Bzowska A, 2024. Vitamin B6 inhibits activity of *Helicobacter pylori* adenylosuccinate synthetase and growth of reference and clinical, antibiotic-resistant *H. pylori* strains. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 39(1): 2372734
- Zhang Z, Hao ZN, Chai RY, Qiu HP, Wang YL, Wang JY, Sun GC, 2022. Adenylosuccinate synthetase MoADE12 plays important roles in the development and pathogenicity of the rice blast fungus. *Journal of Fungi*, 8(8): 780
- Zhu YX, Zhang SS, Yu JJ, 2023. *ZmAdSSI* encodes adenylosuccinate synthetase and plays a critical role in maize seed development and the accumulation of nutrients. *Plant Science*, 330: 111644

[附中文参考文献]

- 杜林娜, 李秀兰, 魏东旭, 陈鸿兵, 姚宇, 杨晶, 2018. 细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶基因的克隆与表达分析. *黑龙江农业科学*, 2018(6): 11-16
- 霍贯中, 张欣濡, 田士军, 李君, 2025. CRISPR/Cas12a 基因编辑技术在植物中的研究进展. *生物技术通报*, 41(6): 1-11
- 农向群, 王蔡霓, 刘蓉, 张泽华, 2022. 绿僵菌与植物的多重关系及其在植物保护中的应用潜力. *植物保护学报*, 48(3): 22-30
- 王玉龙, 刘珍, 刘世红, 汪迅, 李心怡, 陆晨丽, 李晓娟, 黄勃, 2022. 虫尸表面罗伯茨绿僵菌产孢、致病力及其相关基因的表达特征. *植物保护学报*, 49(4): 1241-1251