

# 沙里院褐球蚧蜜露对病原真菌蜡蚧轮枝菌 侵染力的影响\*

薛皎亮\*\* 彭国良 谢映平 张艳峰 韩珍珍

(山西大学生命科学与技术学院 太原 030006)

**摘要** 蚧虫在取食和发育过程中排泄大量蜜露,通过研究蜜露对病原真菌侵染蚧虫的影响,可为应用病原真菌防治蚧虫提供科学依据.于2007年4月自山西省太原市苹果树上沙里院褐球蚧*Rhodococcus sariuoni* Borchsenius雌虫体表采取蜜露,用化学分析方法和氨基酸自动分析仪测定其化学成份;将蜜露稀释为10%、20%、30%、40%、50%共5个浓度,对蜡蚧轮枝菌(*Verticillium lecanii*)的两个菌株No.V3.4504和No.V3.4505进行培养,比较其对菌株胞外蛋白酶和几丁质酶活性的影响.结果发现,该蚧虫蜜露包含可溶性糖(占69%)、水分(占26%)和18种氨基酸.当蜜露稀释浓度为10%时,菌株No.V3.4504的蛋白酶活性最大,为(4.45±0.18) U/mL;随着蜜露浓度增加,蛋白酶活性呈下降趋势;在蜜露浓度为20%时,菌株No.V3.4505的蛋白酶活性出现最大值,为(8.5±0.71) U/mL;随后,蛋白酶活性持续降低.两菌株几丁质酶的活性与蛋白酶活性有相同的变化趋势.在培养基中分别加入氨基酸Ala、Met、Gly、Pro,发现加入Met使菌株No.V3.4504和No.V3.4505的蛋白酶活性分别增长了256.9%和215.7%.表明低浓度的蜜露和培养基中加入适当Met能提高蜡蚧轮枝菌对蚧虫的侵染力.图3 表3 参14

**关键词** 沙里院褐球蚧;蜜露;昆虫病原真菌;蜡蚧轮枝菌;侵染力;蛋白酶;几丁质酶

CLC S476.12 : S436.6

## Effect of Honeydew Excreted by *Rhodococcus sariuoni* on Infection Ability of *Verticillium lecanii*\*

XUE Jiaoliang\*\*, PENG Guoliang, XIE Yingping, ZHANG Yanfeng & HAN Zhenzhen

(College of Life Sciences and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract** Scale insects (*Rhodococcus sariuoni* Borchsenius) (Hemiptera: Coccidae) usually excrete large amount of honeydew when eating and developing. In this paper, the effect of the excreted honeydew on the infection ability of entomopathogenic fungi [*Verticillium lecanii* (Zimmermann) Gams & Zare] was studied for better use of entomopathogenic fungi to control scale insects. The honeydew in the experiment was collected in April, 2007 from the female body surface of *R. sariuoni* in an apple orchard in Taiyuan, Shanxi Province, China. The chemical components of the honeydew were determined using chemical analysis and amino acid automatic analyzer. The honeydew was diluted into five concentrations of 10%, 20%, 30%, 40% and 50%. Two *V. lecanii* strains, No.3.4504 and No.3.4505, were cultured in these honeydew solutions, respectively to compare their extracellular protease and chitinase activities. The results showed that the honeydew of *R. sariuoni* contained 69% soluble sugar, 26% water and 18 amino acids. Strain No.3.4504 showed that the maximum value of its protease activity, (4.45±0.18) U/mL, cultured in the 10% honeydew solution, while in other 4 honeydew solutions, its protease activities decreased with increasing of honeydew concentrations. Comparatively, the value of strain No.3.4505 was higher, (8.5±0.71) U/mL, in 20% honeydew solution. Then, its protease activity went down with increasing of honeydew concentration. The chitinase activities of the two strains appeared a similar variation trend and their maximum activities all appeared when cultured with 10% honeydew solution. Four kinds of amino acids, Ala, Met, Gly and Pro were respectively added in the culture medium to test their effects on the protease activity of the entomopathogenic fungi. The results indicated that the addition of Met made the protease activities of the two strains increased by 256.9% and 215.7%, respectively, which showed that the honeydew at lower concentrations and appropriate Met in the culture medium could promote the infection of *V. lecanii* to the host scale insects. Fig 3, Tab 3, Ref 14

**Keywords** *Rhodococcus sariuoni* Borchsenius; honeydew; entomopathogenic fungus; *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Gams & Zare; infection ability; protease; chitinase

CLC S476.12 : S436.6

蚜虫、蚧虫、粉虱、木虱等刺吸式口器的昆虫都是刺吸

植物汁液为食,它们将植物汁液消化吸收后,一部分多余的液体物质以蜜露的形式排出体外.蚜虫通过虫体腹部末端的腹管排出蜜露,蜜露粘在植物表面,形成油腻腻的一层,称为油汗,蚜虫因此也被称为腻虫.蚧虫的蜜露由腹部末端的肛门排出.这些蜜露都含有水分、糖和氨基酸等物质,既是蚂蚁和其他昆虫的营养物质,也是霉菌的天然培养基,空气中的霉菌落在蜜露表面,就会大量滋生繁殖,导致植物表面被

收稿日期: 2009-08-24 接受日期: 2009-10-30

\*国家自然科学基金项目(No. 30671693)和山西省留学基金项目(No. [2007] 13)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30671693) and the Science Foundation of Shanxi Scholarship Council of China (No.[2007] 13)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: xuejl@sxu.edu.cn)

霉菌的菌丝覆盖,形成烟灰色,抑制植物光合作用和呼吸代谢,称为植物烟霉病<sup>[1-4]</sup>。

虫生真菌和霉菌都是真菌,它们在利用营养物质方面有相同之处。在应用虫生真菌防治蚧虫时,蜜露对虫生真菌的附着和寄生是否会起到促进作用,蜜露的化学成分对虫生真菌侵染力有何影响,在蚧虫生物防治方面具有重要意义,国内外尚未见报道。

前人研究已经发现,虫生真菌侵染昆虫过程中,其蛋白酶活性是决定真菌侵染力的首要因素,可以作为真菌的毒力指标<sup>[5-8]</sup>。Ariane发现某些氨基酸对白僵菌(*Beauveria bassiana*)分泌蛋白酶有调节作用,当培养基中加入甲硫氨酸(Met)时,该菌的蛋白酶活性增强<sup>[9]</sup>。我们的研究也发现,用蜡蚧轮枝菌*Verticillium lecanii* (Zimm.)感染沙里院褐球蚧,其胞外蛋白酶与几丁质酶在轮枝菌入侵蚧虫体壁的过程中起着关键作用<sup>[10]</sup>。蜜露中含有氨基酸,其氨基酸对蜡蚧轮枝菌的蛋白酶是否也有调节作用,目前也未见研究报道。

我们选择排泄蜜露量较大的沙里院褐球蚧*Rhodococcus sariuoni* Borchsenius,测定其蜜露的化学成分;以不同浓度的蜜露作为培养基,培养蚧虫的病原蜡蚧轮枝菌,分析其对轮枝菌蛋白酶和几丁质酶活性的影响;并在基本培养基中分别加入4种氨基酸,测定蜡蚧轮枝菌蛋白酶活性的变化。研究结果为提高蜡蚧轮枝菌对蚧虫的侵染力提供了科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和蜜露

菌种:本试验采用的蚧虫病原真菌是蜡蚧轮枝菌*V. lecanii*两个菌株,2007年购买于中国科学院微生物研究所国家菌种保藏中心,菌株编号为No.V3.4504(原寄主为蚧虫,种名不详)和No.V3.4505[原寄主为稻褐飞虱*Nilaparvata lugens* (Stal)]。在实验室以PDA培养基扩大培养备用。

蜜露:试验用蚧虫蜜露取自沙里院褐球蚧*R. sariuoni*。沙里院褐球蚧在分类上属于半翅目Hemiptera蚧总科Coccoidea蚧科Coccidae,是蔷薇科果树的重要害虫,该虫1年发生1代,在3月下旬到5月份是三龄若虫和雌成虫大量取食危害期,从它们的肛门向外排泄出大量的蜜露<sup>[1]</sup>。我们在2007年4月从山西省太原市南坪头村果园的苹果树上,大量采集从蚧虫肛门排泄的新鲜蜜露,带回实验室在冰箱中4℃保存备用。

### 1.2 试剂与仪器

测定酶活试剂:酪蛋白、酪氨酸、粉状几丁质、N-乙酰氨基葡萄糖为Sigma公司产品;二甲氨基苯甲醛(DMAB)、四硼酸钾、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、三氯乙酸为天津市科密欧化学试剂有限公司产品;95%乙醇为天津天新精细化工开发中心产品;冰醋酸为无锡市化学试剂厂产品;以上试剂均为分析纯。

测定酶活仪器:MODEL868 pH分析仪(Thermo Orion公司);UV755B紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);1-15K型冷冻离心机(Sigma公司);HH·SK恒温水浴锅(北京华恒万仪仪器有限公司);SW-CJ-1K型超净台(苏州净化设备有限公司);SYQ-ZDX-35BI型自动座式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

蜜露组分分析仪器:835-50氨基酸分析仪(日立公司)。

### 1.3 蜜露组分分析

可溶性总糖类的测定:吸取蜜露1 mL,加入5 mL蒽酮试剂混合,沸水浴煮10 min,取出冷却。在625 nm处测定吸光值A<sub>625 nm</sub>值,从标准曲线上得到蜜露中糖的含量<sup>[11]</sup>。测定重复3次,计算平均值。

水分的测定:取洁净的称量瓶,置于95~105℃干燥箱中,干燥0.5~1.0 h后取出,放入干燥器内冷却0.5 h后称量,并重复干燥至恒量为m<sub>1</sub>。然后精密称取1 g蜜露,置于恒重称量瓶中60℃恒温干燥10 h,取出置于干燥器中冷却至室温(0.5 h)然后称重,然后再放入60℃干燥箱中干燥1 h左右,取出,放干燥器内冷却0.5 h后再称量。至前后两次质量差不超过2 mg,即为恒量m<sub>2</sub>,水分的重量为(m<sub>1</sub>+1)-m<sub>2</sub>。测定重复3次,计算平均值。

氨基酸成分的测定:准确称取蜜露5 g,用pH为2.2的柠檬酸钠与盐酸的缓冲溶液,定容在25 mL,取50 μL上机分析,用混合标样作标准曲线,根据出峰时间的先后顺序和峰面积来确定氨基酸种类和氨基酸的含量。测定试验重复3次,计算平均值。测定使用835-50型氨基酸分析仪。

### 1.4 菌种分生孢子悬浮液制备

将蜡蚧轮枝菌接种于PDA平板,在25℃恒温箱中培养7 d,前3 d培养为无光照条件,以利于孢子萌发和菌丝的生长,后4 d光照和黑暗交替培养(L:D=14:10),以促进分生孢子的形成。然后用0.05%吐温Tween-80溶液洗脱分生孢子,在显微镜下以血球计数板检测分生孢子浓度,并将其配置成浓度为5×10<sup>7</sup>孢子/mL的悬浮液备用。

### 1.5 菌种在蜜露培养基上的培养和酶液制备

菌种培养采用沙里院褐球蚧蜜露溶液作为菌种的培养基,配置蜜露的比例分别为10%、20%、30%、40%、50% 5种梯度,灭菌后分别接种1%的孢子悬浮液。置于摇床上在125 r/min和25℃条件下培养4 d。将上述培养得到的菌液于4℃在离心机上用离心力为8 500 g离心20 min后,取上清液即为制备的酶液,将该酶液于-20℃下保存,为测定蛋白酶和几丁质酶活性备用。

### 1.6 基本培养基和酶液制备

配制基本培养基(NaNO<sub>3</sub> 6 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、KCl 0.5 g、FeSO<sub>4</sub> 1 mg、ZnSO<sub>4</sub> 1 mg、蒸馏水1 000 mL、葡萄糖10 g),将Ala、Pro、Gly和Met加入20 mL基本培养基中,灭菌,接菌,培养4 d,离心,取上清液即为酶液于-20℃保存,为测定蛋白酶活性备用。

配制不同浓度的Met(0.25%、0.5%和0.75%)加入20 mL MM培养基中灭菌,接菌,培养,离心,取上清液即为酶液于-20℃保存,为测定蛋白酶活性备用。

### 1.7 蛋白酶和几丁质酶活性测定

蛋白酶活性测定:蜡蚧轮枝菌胞外蛋白酶的活性分析以酪蛋白为底物,用Tris-HCl缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.5)配成1%的(w/V)的酪蛋白溶液,取此溶液1.0 mL加入上述制备好的待测酶液1.0 mL于试管中,37℃反应30 min,用3 mL 0.4 mol/L三氯乙酸终止反应。取另一试管加酶液1.0 mL,加3 mL 0.4 mol/L三氯乙酸,混匀,然后加1.0 mL酪蛋白溶液,作为对照。过滤,取1 mL过滤液,加5 mL 0.55 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>混匀后

加入Folin试剂1 mL, 立即混匀. 显色30 min. 用分光光度计在680 nm处测吸光值 $A_{680\text{ nm}}$ , 根据标准曲线, 计算酶活. 以每分钟催化分解蛋白质生成1  $\mu\text{g}$ 酪氨酸的酶量为一个酶活单位<sup>[12]</sup>. 酶活测定试验设3次重复.

几丁质酶活性测定: 吸取0.5 mL上述制备好的待测酶液, 加入0.5 mL胶状几丁质, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 下温浴4 h. 以8 500 g的离心力离心5 min使酶解反应停止. 吸取0.2 mL上清液加入0.08 mL四硼酸钾溶液, 摇匀, 在沸水浴中反应5 min, 迅速用自来水冷却至室温. 加入1.2 mL 10%的DMAB试剂, 在37  $^{\circ}\text{C}$ 下保温20 min, 再用自来水将反应体系冷却至室温. 用分光光度计在585 nm处测定吸光值 $A_{585\text{ nm}}$ , 根据标准曲线, 计算酶活. 以每分钟催化分解几丁质生成1  $\mu\text{g}$  N-乙酰胺基葡萄糖的酶量为一个酶活单位<sup>[13]</sup>. 酶活测定试验设3次重复.

## 2 结果与分析

### 2.1 沙里院褐球蚧排泄蜜露观察

沙里院褐球蚧以二龄若虫在苹果等寄主枝条上越冬, 第二年春季随着树液流动, 三龄雌性若虫开始出蛰, 刺吸植物汁液取食, 若虫肛门上就开始有小的半透明液滴排出, 即为蜜露. 沙里院褐球蚧是蜜露排泄量较多的蚧虫, 春末夏初该蚧虫发育为成虫, 进入取食盛期, 排泄蜜露量最大, 可以看到蜜露形成半透明的球状露珠, 附着在虫体背面(图1), 蜜露珠的流动性差, 用手捻捏有油腻粘性感. 随着排泄过程, 一部分蜜露会溅射到蚧虫周围, 粘在寄主枝条和叶片表面, 形成粘乎乎一层, 象油泼过一样. 空气中的霉菌落在上面, 便以这些蜜露为营养, 开始繁殖滋生, 最后霉菌的菌丝覆盖.

### 2.2 沙里院褐球蚧蜜露组分分析

对沙里院褐球蚧蜜露的成分分析结果(表1)显示, 蜜露中可溶性糖的含量最大, 占69%, 水分的含量次之, 占26%, 其它物质, 包括氨基酸和一些未检测到的物质占5%. 经对蜜露中氨基酸成分测定发现, 蜜露中共含17种氨基酸, 每100 g蜜露中氨基酸的总含量为170.0 mg, 其中天冬氨酸(Asp)和苏氨酸(Thr)的含量较高, 分别占总氨基酸的30%和19.9%, 其余依次是丝氨酸(Ser)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、谷氨酸(Glu)、丙氨酸(Ala)和脯氨酸(Pro)等(表2). 从蜜露中含糖和氨基酸来讲, 可以为蜡蚧轮枝菌生长和繁殖提供必要的C源和N源; 蜜露中所含水分也为该菌提供了繁殖的必要条件.

### 2.3 蜜露对蜡蚧轮枝菌蛋白酶和几丁质酶活性的影响

从蜜露的化学成分分析可以知道, 蜜露中包含的糖、氨基酸和水分能为蜡蚧轮枝菌提供必要的营养物质, 但不清楚其高糖量对菌的生长和侵染是否完全有利. 将沙里院褐球

蚧蜜露稀释为5个浓度梯度, 分别培养蜡蚧轮枝菌两个菌株No.V3.4504和No.V3.4505, 测定其蛋白酶和几丁质酶的活性, 分析蜜露对两种酶活的影响. 结果发现, 菌株No.V3.4504的蛋白酶活性随蜜露浓度的增加呈下降趋势(图2-A), 当蜜露的浓度为10%时, 蛋白酶的活性最大, 为(4.45 $\pm$ 0.18) U/mL, 当蜜露的浓度为50%时, 蛋白酶的活性最低, 为(0.47 $\pm$ 0.04) U/mL, 作趋势方程 $y = -0.099x + 5.4$  ( $r = 0.99$ ), 说明呈一次函数降低; 菌株No.V3.4505蛋白酶活性的变化趋势是先上升后下降, 在蜜露浓度为20%时有最大值, 为(8.5 $\pm$ 0.71) U/mL, 蜜露浓度为50%时, 蛋白酶的活性为(0.38 $\pm$ 0.23) U/mL, 作趋势方程 $y = 0.001x^3 - 0.067x^2 + 1.68x - 4.897$  ( $R^2 = 0.91$ ), 符合三次函数规律.

同时发现, 两个菌株的几丁质酶活性变化呈相同的趋势, 都是随蜜露浓度的增加而降低(图2-B). 对菌株No.V3.4504, 当蜜露的浓度为10%时, 几丁质酶的活性最大, 为(0.144 $\pm$ 0.012) U/mL, 当蜜露的浓度50%时, 几丁质酶的活性最低, 为(0.014 $\pm$ 0.007) U/mL; 对菌株No.V3.4505, 当蜜露的



图1 沙里院褐球蚧及其排泄的蜜露

Fig.1 *R. sariuoni* and its honeydew

A: 蜜露排出附着在虫体背面肛门附近; B: 蚧虫群体蜜露状

A: Honeydew drop attached over anus of the scale; B: Honeydews excreted by many individuals of the scale insects

表1 沙里院褐球蚧蜜露组分

Table 1 Components of honeydew excreted by *R. sariuoni*

蜜露组分 Honeydew component	含量 Content (w/g g <sup>-1</sup> )	P/%
可溶性糖 Dissoluble sugar	0.69 $\pm$ 0.02	69
水 H <sub>2</sub> O	0.26 $\pm$ 0.03	26
其他 Others	0.05 $\pm$ 0.01	5
合计 Total	1.00	100

表2 蜜露中氨基酸的成分

Table 2 Amino acids in honeydew

氨基酸 Amino acid	天冬氨酸 Asp	苏氨酸 Thr	丝氨酸 Ser	谷氨酸 Glu	脯氨酸 Pro	甘氨酸 Gly	丙氨酸 Ala	半胱氨酸 Cys	缬氨酸 Val
含量 Content [w/mg (100 g) <sup>-1</sup> ]	51.0	33.9	24.4	7.8	2.8	2.2	4.3	0.7	2.6
P/%	30.0	19.9	14.4	4.5	1.6	1.2	2.5	0.4	1.5
氨基酸 Amino acid	蛋氨酸 Met	异亮氨酸 Ile	亮氨酸 Leu	酪氨酸 Tyr	苯丙氨酸 Phe	赖氨酸 Lys	组氨酸 His	精氨酸 Arg	
含量 Content [w/mg (100 g) <sup>-1</sup> ]	2.3	1.2	0.7	2.2	2.2	2.6	10.6	18.1	
P/%	1.3	0.7	0.4	1.3	1.3	1.5	6.7	10.6	

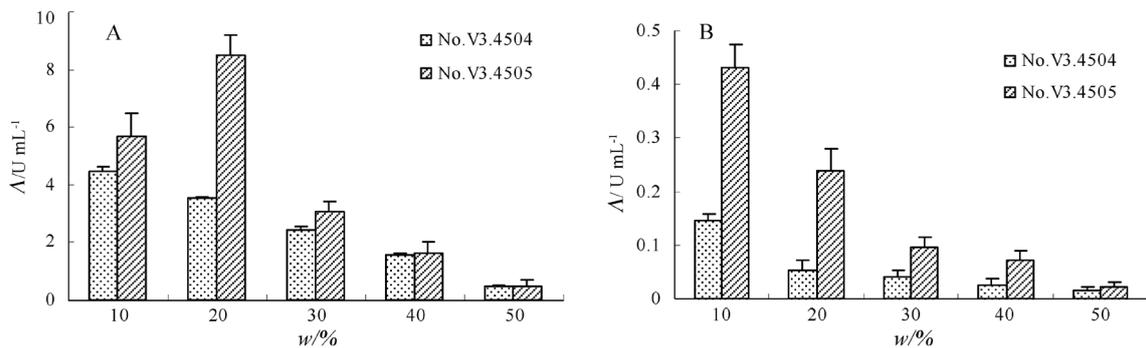


图2 蜡蚧轮枝菌两菌株在不同浓度蜜露培养条件下蛋白酶活性(A)和几丁质酶活性(B)的变化

Fig. 2 Protease activities (A) and chitinase activities (B) of the two strains of *V. lecanii* cultured with honeydew at different concentrations

表3 蜡蚧轮枝菌两菌株在不同培养基中蛋白酶的活性

Table 3 Protease activity of *V. lecanii* cultured with different substrates for 8 days

培养基中氨基酸比率 Percentage of amino acids in medium	菌株 Strain No.V3.4504			菌株 Strain No.V3.4505		
	蛋白酶活性 Protease activity (λ/U g <sup>-1</sup> )	增加率 Increment (r/%)	差异显著性 Significant difference (P<0.05)	蛋白酶活性 Protease activity (λ/U g <sup>-1</sup> )	增加率 Increment (r/%)	差异显著性 Significant difference (P<0.05)
Glucose (1%)	1.44±0.3	—	a	0.38±0.1	—	b
Ala (0.5%)	2.43±0.1	68.8%	b	0.1±0.01	-73.6%	a
Met (0.5%)	5.14±0.2	256.9%	c	1.2±0.1	215.7%	c
Gly (0.5%)	1.55±0.2	7.6%	a	0.08±0.04	-78.9%	a
Pro (0.5%)	0.91±0.1	-36.8%	a	0.12±0.04	-68.4%	a

蛋白酶活性数据是3次独立实验(各2个重复)结果的平均值(Mean±SE)

The data of protease activity in the table are the means of the results from three independent experiments, each with two repeats

浓度为10%时,几丁质酶的活性最大,为(0.431±0.042) U/mL,当蜜露的浓度50%时,几丁质酶的活性也是最低,为(0.022±0.008) U/mL.但比较而言,菌株No.V3.4505的几丁质酶活性比菌株No.V3.4504的几丁质酶活性高。

上述结果说明:1)蜜露中高浓度糖对蜡蚧轮枝菌的蛋白酶和几丁质酶活性有抑制作用,因此在虫分泌蜜露前期应用蜡蚧轮枝菌会有好的效果;2)两个菌株比较,菌株No.V3.4505更能适应在蜜露上生存。

#### 2.4 不同氨基酸对蜡蚧轮枝菌蛋白酶活性的影响

蜜露中测到18种氨基酸,但它们的相对含量较少,为探讨氨基酸对蜡蚧轮枝菌蛋白酶的调节作用,在蜡蚧轮枝菌基本培养基中分别加入氨基酸Ala、Met、Gly和Pro,与没有加入氨基酸的培养基中蜡蚧轮枝菌的蛋白酶活性进行比较.结果(表3)显示,蜡蚧轮枝菌在所有的培养基中都能分泌蛋白酶,但是分泌的蛋白酶活性不同.菌株No.V3.4504在加有Met的基本培养基中蛋白酶的活性最大,为(5.14±0.2) U/mL,与其余4种培养基蛋白酶的活性相比差异显著,在加有脯氨酸Pro的基本培养基蛋白酶的活性最小,为(0.91±0.1) U/mL.菌株No.V3.4505是在加有Met的基本培养基中蛋白酶的活性为(1.2±0.1) U/mL,与其余4种培养基蛋白酶的活性相比差异显著.总体来看,虽然菌株No.V3.4504的蛋白酶活性菌高于菌株No.V3.4505.但在培养基中加入氨基酸Met对提高蜡蚧轮枝菌蛋白酶活性有明显作用。

#### 2.5 不同浓度蛋氨酸对蜡蚧轮枝菌蛋白酶活性的影响

为探讨培养基中蛋氨酸Met的含量变化对蜡蚧轮枝菌蛋白酶活性的影响,在培养基中加入Met,使其含量分别占培养基的0.25%、0.5%和0.75%,分别培养菌株No.V3.4504,经

过8 d培养后,测定蜡蚧轮枝菌蛋白酶活性.结果显示,菌株No.V3.4504在加有Met的基本培养基中蛋白酶活性最高,加入不同浓度Met后观察浓度对蛋白酶活性的影响,结果如图3所示,在两种培养基中加入不同浓度的Met培养蜡蚧轮枝菌,发现蛋白酶的活性不同,当Met的浓度为0.25%时,蛋白酶的活性为(4.21±0.54) U/mL, Met的浓度提高到0.5%时,蛋白酶的活性也随之增加,为(5.14±0.20) U/mL,两者差异不显著,说明Met在0.25%~0.5%浓度范围内对该菌的蛋白酶的活性都有促进作用.而Met的浓度达到0.75%时,蛋白酶的活性反而下降,为(0.76±0.30) U/mL,比空白还低,说明Met作为蛋白酶的调节剂,有一定的浓度要求。

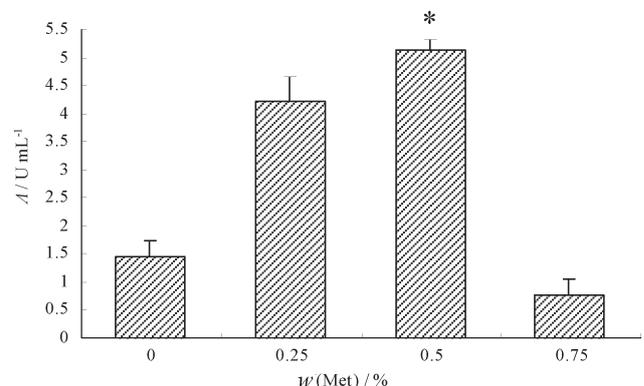


图3 培养基中不同浓度蛋氨酸对蜡蚧轮枝菌蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Protease activity of *V. lecanii* cultured with Met at different concentrations

结果是3次独立实验(各2个重复)结果的平均值(Mean±SE). \* P<0.05  
The results are the means from the three independent experiments, each with two repeats.

### 3 讨论

昆虫病原真菌胞外蛋白酶和几丁质酶在一定程度上反应了菌种对寄主昆虫的感染能力,这在病原菌 *Beauveria bassiana* 和 *Metarhizium anisopliae* 上都得到了验证<sup>[5-7]</sup>,胞外蛋白酶和几丁质酶的产生主要受生长基质中的葡萄糖、氮源等成分的影响。本研究对沙里院褐球蚧蜜露的化学成分测试结果说明,其蜜露中水分占26%,可溶性糖占69%,并含有17种氨基酸。以沙里院褐球蚧的蜜露为培养基,培养蜡蚧轮枝菌两个菌株No.V3.4504和No.V3.4505,发现蜜露的浓度对菌株的蛋白酶和几丁质酶活性有调控作用,当蜜露的浓度在10%时,菌株蛋白酶的活性最高,当蜜露的浓度在20%时,菌株几丁质酶的活性最高,说明蚧虫的蜜露能为蜡蚧轮枝菌在该蚧虫表面附着生长提供营养。这与自然中霉菌利用蚧虫蜜露大量滋生相似<sup>[1-2]</sup>。但是当蜜露浓度越高时,菌株的蛋白酶和几丁质酶的活性却降低,这是本次研究的新发现。蚧虫蜜露的主要成分为可溶性糖,在自然情况下蜜露在虫体上凝聚成半透明的蜜露球,稠而粘,这样虽然蜜露中糖分是蜡蚧轮枝菌繁殖发育所需要的碳源,但是过高的糖含量对菌株产生蛋白酶和几丁质酶有一定的抑制作用。这一结果与在米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 和大链壶菌 (*Lagaridium giganteum*) 液体培养中,发现葡萄糖的浓度与胞外蛋白酶的生成反比的结果相似。因此,蚧虫蜜露在一定的稀释浓度条件下更适宜蜡蚧轮枝菌生长和提高蛋白酶与几丁质酶的活性,这为实际应用提供了理论依据。

沙里院褐球蚧蜜露中除了可溶性糖以外,还存在17种氨基酸。这些氨基酸可以作为蜡蚧轮枝菌的氮源,研究表明培养基中氨基酸的含量多少能调节蜡蚧轮枝菌蛋白酶和几丁质酶的活性<sup>[6-7]</sup>。本研究在培养基中分别加入4种氨基酸,发现加入Met能诱导两菌株蛋白酶的生成,但加入氨基酸Pro、Gly、Ala并不能增加其蛋白酶的生成。这说明并不是所有的氨基酸都对虫生真菌有促进作用,其中有一些是关键氨基酸,起到的作用就比较明显。Campo *et al.* (2005) 在蝉虫 (*Boophilus microplus*) 的表皮培养基中加入氨基酸Ala,也发现使白僵菌蛋白酶活性降低的现象,说明Ala可能抑制白僵菌蛋白酶的分泌<sup>[14]</sup>。Ariane (2008) 也报道了在培养基中加入Met,白僵菌蛋白酶活性为0.258 U/ $\mu$ g,但在培养基中加有其他3种氨基酸时,培养基中白僵菌蛋白酶的活性都低于前者<sup>[9]</sup>。同时发现,氨基酸的浓度对调控菌株的蛋白酶活性具有重要作用,用Met在3个浓度的试验中,当Met在0.25%和0.50%培养条件下,蛋白酶处于高活性,当浓度为增加为0.75%时,蛋白酶活性反而将低,说明高浓度的Met能抑制菌株蛋白酶的分泌。这一结果也为在生物防治中应用蜜露和氨基酸调控蜡蚧轮枝菌的蛋白酶活性提供了参考依据。但是,对于Met是如何调节蜡蚧轮枝菌蛋白酶活性,还有待进一步研究。

本研究结果显示,在同样条件下,菌株No.V3.4505的蛋白酶和几丁质酶活性比菌株No.V3.4504的活性高,其原因可能是两个菌株分别来自不同的寄主昆虫,它们的遗传和营养适应性有一定的差别,由此显示菌株No.V3.4505对沙里院褐球蚧的蜜露适应性更好,这为实际应用病原真菌进行蚧虫生物防治时重视菌株的筛选提供了参考依据。

### References

- Xie YP (谢映平). The Scale Insects of the Forest and Fruit Trees in Shanxi of China. Beijing, China: China Forestry Publishing House (北京: 中国林业出版社), 1998. 33~60
- Ben-Dov Y, Hodgson CJ. Soft Scale Insect Their Biology, Natural Enemies and Control. Netherlands: Elsevier science BV, 1997, 7A (1): 291~373
- Bogo A, Watson GW, Mantle PG, Mottana GM. Honeydew sugars eliminated by *Stigmacoccus asper* Hempel (Hemiptera: Margarodidae) feeding on leguminous trees in Brazil. *Entomologica*, 1999, 33: 275~278
- Beggs JR, Karl BJ, Wardle DA, Bonner KI. Soluble carbon production by honeydew scale insects in a New Zealand beech forest. *New Zealand J Ecol*, 2005, 29 (1): 105~115
- Feng MG. Reliability of extracellular protease and lipase activities of *Beauveria bassiana* isolates used as their virulence indices. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 1998, 38 (6): 461~467
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Exp Mycol*, 1988, 12: 161~168
- Barreto CC, Staats CC, Schrank A, Vainstein MH. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Curr Microbiol*, 2004, 48: 102~107
- St. Leger RJ, Roberts DW, and Staples RC. A model to explain differentiation of *Appressoria* by germinating of *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol*, 1991, 57: 299~311
- Donatti AC, Luciana FM, Maria PF. Production and regulation of cuticle-degrading protease from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. *Curr Microbiol*, 2008, 56: 256~260
- Peng GL (彭国良), Xue JL (薛皎亮), Liu WM (刘卫敏), Xie YP (谢映平). Role of protease and chitinase of *Verticillium lecanii* in infecting scale insect cuticle. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2009, 15 (2): 220~225
- Zhang ZL (张志良), Qu WJ (瞿伟菁). The Experimental Guide for Plant Physiology. III Edition. Beijing, China: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 2003. 127~129
- Wang XQ (王秀奇), Qin SY (秦淑媛), Gao TH (高天慧), Yan HJ (颜卉君). Experiments in Basic Biochemistry. 2nd ed. Beijing, China: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 1999. 177~180
- Cao GC (曹广春). Studies on resistance of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) to tebufenozide and the mechanisms: [Doctor Degree Dissertation]. Nanjing, China: Nanjing Agricultural University (南京: 南京农业大学), 2007. 65
- Campos RA, Arruda W, Boldo JT, Silva MV, Barros NM, Azevedo JL, Schrank A, Vainstein MH. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Curr Microbiol*, 2005, 50: 257~261