

蜡蚧轮枝菌入侵蚧虫表皮过程中蛋白酶和几丁质酶的作用*

彭国良 薛皎亮** 刘卫敏 谢映平

(山西大学生命科学与技术学院 太原 030006)

摘要 研究了蜡蚧轮枝菌两个菌株No. V3.4504和No. V3.4505感染沙里院褐球蚧的外观症状、入侵体壁的过程及胞外蛋白酶与几丁质酶的作用。结果发现,用菌株No. V3.4504的孢子悬浮液感染蚧虫2 d后,在虫体表面蜡粉稀薄的位置和柔软的虫体腹面出现了菌丝,5 d后菌丝覆盖虫体,7 d后菌丝层加厚,虫体开始死亡。显微切片观察,在体壁的外表皮、内表皮和真皮层都发现了菌丝,说明该菌已感染成功。以蚧虫的表皮为培养基对这两个菌株连续培养8 d,发现菌株No. V3.4504的蛋白酶活性在前6天连续上升,最大值为 (33.94 ± 1.61) U/g,然后降低;几丁质酶活性在前期维持在一个较低水平,5 d开始增加,最大值为 (7.28 ± 1.36) U/g。菌株No. V3.4505的蛋白酶和几丁质酶的活性变化趋势与No. V3.4504相似。说明蛋白酶在菌丝侵染体壁的前期发挥了作用,降解表皮中的蛋白质,使几丁质暴露,诱导几丁质酶的大量产生,从而分解几丁质。图3 表2 参22

关键词 蜡蚧轮枝菌; 蚧虫; 沙里院褐球蚧; 表皮; 蛋白酶; 几丁质酶

CLC S476.12 : S433.3

Role of Protease and Chitinase of *Verticillium lecanii* in Infecting Scale Insect Cuticle*

PENG Guoliang, XUE Jiaoliang**, LIU Weimin & XIE Yingping

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

Abstract Two strains No. V3.4504 and No. V3.4505 of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* (Zimm.) were studied on the appearance of their infection to the scale insect, *Rhodococcus sariuoni* Borchsenius, and the process of inbreak and the role of their extracellular protease and chitinase. The results showed that after 2 days the scale insect was infected with spore suspension of the strain No. V3.4504, a few of hyphae appeared first on some parts of body surface with thinner wax powder. On d 5, hyphae almost covered the whole body of the scale. Up to d 7, hyphae layer became thicker and the scale insect was dying. Meanwhile, on the micrograph of integument of the scale, hyphae were found in exocuticle, endocuticle and epidermis. It means that this entomopathogenic fungus had infected the insect successfully. The two strains of *V. lecanii* were cultivated for 8 d continuously on the culture medium prepared with cuticle material of the scale insect. It was found the protease activity of the strain No. V3.4504 increased continuously in the first 6 days and gave a maximum value (33.94 ± 1.61) U/g, and then decreased. Meanwhile, its chitinase activity maintained at a lower level at the earlier stage, then began to rise from d 5, at last the maximum value reached (7.28 ± 1.36) U/g. A similar changing trend was found in the protease and chitinase activities in the strain No. V3.4505. It indicated that, the protease of the fungus played an important role in the early phase to decompose protein in the cuticle and made chitin exposure during *V. lecanii* infected the scale insect. With the decomposing of protease, the chitinase was induced plentifully and chitin in the cuticle was subsequently decomposed. Fig 3, Tab 2, Ref 22

Keywords *Verticillium lecanii* (Zimm.); scale insect; *Rhodococcus sariuoni* Borchsenius; cuticle; protease; chitinase

CLC S476.12 : S433.3

蚧虫在分类学上属于昆虫纲(Insecta)半翅目(Hemiptera)蚧总科(Coccoidea),在全世界已记录20科约7 000余种,其中我国有700余种。蚧虫分布广,寄主多,是林木、果树和观赏花卉的重要害虫,同时还危害牧草和农作物。蚧虫的最大特点是虫体具有多种蜡腺,能分泌蜡质,在虫体表面形成

厚蜡壳。由于蜡壳的保护,蚧虫对外界不利条件的干扰具有很强的抵御能力,化学防治也很难奏效。因此,开展以生物防治为主要手段的防治策略是实现可持续控制的重要途径。生物防治包括应用天敌昆虫和病原微生物。蚧虫在自然界中的病原菌相对较少,目前记录最重要的是蜡蚧轮枝菌*Verticillium lecanii* (Zimm.),它是一种虫生真菌,属于半知菌亚门(Deuteromycotina)丝胞纲(Hyphomycetes)丛梗孢目(Moniliales)丛梗孢科(Moniliaceae)轮枝菌属(*Verticillium*)。该菌最早由Nivter于1861年在锡兰发现寄生咖啡蜡蚧*Lecanii coffeae*,从上世纪以来,已在世界很多地方发现寄生蚧科

收稿日期: 2008-09-01 接受日期: 2008-12-03

*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 Province Scholarship Council of China (No. [2007] 13)

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

(Coccidae)、盾蚧科(Diaspididae)、粉蚧科(Pseudococcidae)、珠蚧科(Margarodidae)的30多种蚧虫^[1,2]。但是,目前将蜡蚧轮枝菌主要用于防治蚜虫、粉虱和螨类^[3-5],而在蚧虫上的应用却很少^[6,7]。在我国蜡蚧轮枝菌用于蚧虫的防治试验只有殷凤鸣等用该菌喷雾防治湿地松粉蚧*Oracella acuta* (Lobdell)^[8]和袁盛勇用孢子悬浮液感染吹绵蚧*Icerya purchasi* Maskell的报道^[9]。上述研究都还局限于病原菌的调查记录和简单的防治试验,对于轮枝菌如何入侵蚧虫以及在入侵过程中该菌的蛋白酶和几丁质酶等胞外酶的作用和变化规律还未见报道,而这方面的研究对将蜡蚧轮枝菌成功应用于蚧虫的生物防治十分重要。

虫生真菌通过体壁侵染致死昆虫的过程包括机械作用和酶的作用^[10,11]。当真菌在穿透昆虫体壁的过程中能够分泌蛋白质酶、几丁质酶、脂酶、酯酶和淀粉酶等胞外酶^[12-14],其中蛋白酶对体壁的降解在影响侵入过程的因素当中被认为是最主要的,因为蛋白质是构成昆虫表皮的主要成份。胞外蛋白酶能通过降解寄主表皮的蛋白质促进菌丝或孢子穿透寄主表皮,从而实现入侵。冯明光等发现球孢白僵菌胞外蛋白酶与白僵菌对黑血蝗*Melanoplus sanguinipes*的毒力有着密切相关性,胞外蛋白酶与蝗虫死亡率的相关性可以达到0.67,据此提出用蛋白酶作为菌种毒力初期筛选的指标^[15]。几丁质酶能特异地催化水解几丁质的 β -1,4-糖苷键生成N-乙酰-D-氨基葡萄糖(NAG),直接参与几丁质的代谢过程,在虫生真菌侵染昆虫的过程中发挥重要的作用^[16]。几丁质酶通过降解昆虫表皮几丁质,使虫生真菌成功入侵昆虫表皮,同时降解的产物为真菌的生长提供营养。

为了了解蜡蚧轮枝菌的蛋白酶和几丁质酶在该菌侵染蚧虫表皮过程中的作用,本文将蜡蚧轮枝菌两个菌株的孢子悬浮液去感染苹果树的重要蚧虫沙里院褐球蚧*Rhodococcus sariuoni* Borchsenius (蚧总科Coccoidea, 蚧科Coccidae)雌成虫,观察虫体染菌后的外观症状,结合该蚧虫表皮的形态结构和化学成分,以蚧虫表皮为培养基,对这两个菌株进行培养,测定和比较了其蛋白酶和几丁质酶的活力变化,为揭示蜡蚧轮枝菌侵染蚧虫过程中这两种酶的作用机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种与蚧虫

本试验采用的蜡蚧轮枝菌两个菌株,购买于中国科学院微生物研究所菌种保藏中心,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)]。将两菌株在实验室以PDA为培养基扩大培养备用。

试验蚧虫为沙里院褐球蚧雌成虫,2007年4月采集于山西省太原市南坪头村果园的苹果树上。采集时用枝剪将带有蚧虫的枝条剪下,带回实验室备用。

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_2CO_3 、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)。

蚧虫体壁石蜡切片制备试剂:0.9%生理盐水、戊二醛固定液、石蜡、冰醋酸为天津市科密欧化学试剂公司产品;醋酸异戊酯、乙醇、二甲苯为天津天新精细化工开发中心产品;氨水、铁矾、苏木精溶液为北京化工厂产品;液体树胶为上海华申试剂公司产品。以上试剂均为分析纯。

蚧虫体壁石蜡切片制备和显微观察仪器:STAT820石蜡切片机(Reichert Histo公司);OLYMPUS体视显微镜,OLYMPUS光学显微镜型号BX51。

1.3 菌种分生孢子悬浮液的制备

将蜡蚧轮枝菌接种于PDA平板,在25℃恒温箱中培养7d,前3天培养为无光照条件,以利于孢子萌发和菌丝的生长,后4天光照交替培养(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,并将其配置成孢子浓度为 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的悬浮液备用。

1.4 蚧虫染菌与症状观察

将采集的新鲜沙里院褐球蚧,连同枝条(10cm长)在孢子浓度为 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的悬浮液中浸2s,用镊子将其放入培养皿(12cm×2cm)中,置于培养室(25℃,RH70%)培养,逐日观察和记录。用Olympus体视显微镜观察并拍照。

1.5 蚧虫体壁的石蜡切片制备与观察

分别取采集的新鲜蚧虫虫体和染菌后培养的罹病虫体浸泡于5%的戊二醛固定液中固定48h,用固定好的虫体制备石蜡切片,切片方法参照段续川改订海登汉的铁矾苏木精法^[17];用OLYMPUS光学显微镜观察正常虫体和罹病虫体的体壁构造。

1.6 蚧虫表皮作为菌种培养基的预处理

将沙里院褐球蚧从苹果树枝条上用镊子剥下置于小烧杯中,用自来水反复冲洗,除去杂质。清除虫体内脏,保留体壁。将体壁浸泡在氯仿中,反复震荡,使其表面的蜡粉完全溶解。再用酒精将氯仿洗去,用自来水反复冲洗,除去酒精。将得到的表皮置于烘箱中,100℃烘干。将烘干的体壁研磨成粉末,过筛(40目)备用。

1.7 菌种在蚧虫表皮培养基上的培养和酶液的制备

菌种培养:准确称取上述备用的蚧虫表皮粉末0.2g置于每个培养皿(5cm×1cm)中,用蒸馏水湿润作为培养基,灭菌。灭菌后每个培养皿内接种1mL孢子浓度为 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的菌悬液,置于培养室(25℃,RH70%)连续培养8d。

酶液制备:将上述各培养皿中培养好的蜡蚧轮枝菌分别溶于5mL磷酸缓冲液(pH=7)中,离心(8500g,4℃,20min)后,取上清液即为酶液,于-20℃保存,为测定蛋白酶和几丁质酶活性备用。

1.8 蛋白酶和几丁质酶的活性测定

蛋白酶活性测定: 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, 于37 °C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 Na₂CO₃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 μg 酪氨酸的酶量为一个酶活单位.

几丁质酶活的测定: 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 °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 °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 μg N-乙酰胺基葡萄糖的酶量为

一个酶活单位.

2 结果与分析

2.1 蜡蚧轮枝菌感染沙里院褐球蚧的外观症状

沙里院褐球蚧1 a发生1代, 以2龄若虫越冬, 越冬若虫多固着在1~2 a生枝上、芽鳞旁、树皮皱褶裂缝等部位. 越冬后雌性若虫发育为3龄, 然后很快进入雌成虫阶段, 虫体迅速膨大成卵圆形, 红褐色, 表面分泌一层薄蜡粉. 用蜡蚧轮枝菌(菌株编号: No. V3.4504)的菌悬液(孢子浓度为 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)感染沙里院褐球蚧, 染菌1 d后, 虫体表面没有出现菌丝. 染菌2 d后, 在虫体表面蜡粉稀薄的位置出现了菌丝(图1-A), 并发现虫体腹面贴于树皮, 湿度比背面的大, 菌丝在体缘和腹面比背面的多, 虫体腹面表皮薄而柔软, 也使菌丝容易侵染. 染菌5 d后, 可以看到蚧虫表面菌丝大量生长且交织在一起(图1-B), 表皮开始出现褶皱, 虫体收缩变小. 染菌7 d后, 菌丝层加厚, 虫体表皮萎缩, 开始死亡(图1-C).

2.2 沙里院褐球蚧表皮结构及菌丝的入侵过程

用蜡蚧轮枝菌(菌株编号: No. V3.4504)的孢子悬液感染沙里院褐球蚧后, 观察发现, 附着在体壁的分生孢子萌发形成菌丝, 当菌丝遇到体壁时形成侵入体壁的特化器——附

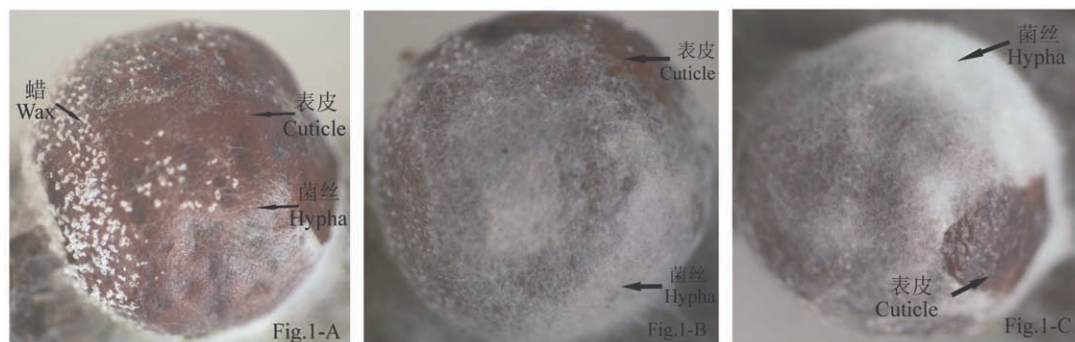


图1 蜡蚧轮枝菌感染后沙里院褐球蚧雌成虫的症状

Fig. 1 Symptom of *R. sariuoni* adult female infected by *V. lecanii*

A: 感染后2 d虫体表面局部出现菌丝; B: 感染后5 d虫体表面生长大量菌丝; C: 感染后7 d虫体表面布满菌丝, 表皮萎缩

A: Showing the hyphae appearing on a small part of surface of scale insect after infected for 2 d; B: Mass hyphae covering the most part of surface of scale insect infected after 5 d; C: A thick layer of hyphae covering the whole surface of scale insect and its cuticle shrunk infected after 7 d

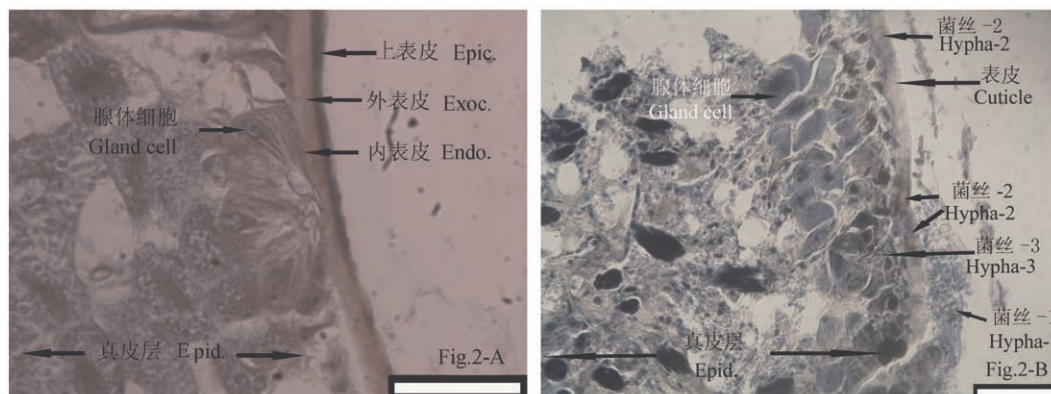


图2 沙里院褐球蚧雌成虫体壁的显微结构

Fig. 2 Micrograph of integument *R. sariuoni* adult female

A: 未受蜡蚧轮枝菌感染的体壁结构(比例尺50 μm), 显示表皮分层清晰, 结构完整; B: 受蜡蚧轮枝菌感染的体壁结构(比例尺50 μm), 显示表皮外的菌丝堆积(菌丝-1), 菌丝进入表皮层(菌丝-2), 深入真皮层(菌丝-3), 表皮受损, 分层模糊

A: The integument uninfected by *V. lecanii* showing that cuticle configuration was clear and intact (Bar: 50 μm). B: The integument infected by *V. lecanii* showing that mass hyphae adhibited closely to cuticle (hypha-1), hyphae got into cuticle layer (hypha-2) and then invaded into epidermis (hypha-3). The cuticle was destroyed by the fungus and the layers got illegibility (Bar: 50 μm)

着胞,在附着胞的先端适当位置会产生锥形侵染钉或侵染菌丝,有利于对蛱虫体壁的穿透。当侵染钉穿透蛱虫体表面蜡层接触到体壁时,首先遇到蛱虫的表皮。沙里院褐球蚧表皮的结构从外向内依次由上表皮(Epicuticle)、外表皮(Exocuticle)和内表皮(Endocuticle)3层组成(图2-A)。上表皮很薄,厚度仅2 μm (0.5~3 μm),构成它的化学物质主要是疏水性的脂肪和碳水化合物。外表皮和内表皮很厚,厚度17.0 μm (15~18.7 μm),主要由蛋白质和几丁质组成。附着胞分泌一系列降解表皮成分的蛋白酶和几丁质酶等胞外酶,这些酶能分解表皮的蛋白质和几丁质,造成体壁破坏,使菌丝成功入侵。显微镜下对受感染蛱虫体壁组织石蜡切片(图2-B)后观察发现,体壁表面覆盖厚菌丝层(菌丝-1),这些菌丝向表皮入侵,在表皮层多处位置可以看到菌丝(菌丝-2),穿过表皮层后,菌丝进入体壁的细胞层即真皮层(菌丝-3),由于菌丝的入侵导致表皮层受损,使原来表皮清晰的分层变得模糊不清。在菌丝入侵体壁过程中,它们依靠分泌蛋白酶和几丁质酶,破坏体壁,才使其成功穿透体壁。

2.3 蜡蚧轮枝菌侵染蛱虫体壁过程中蛋白酶和几丁质酶活性的变化趋势

以沙里院褐球蚧的表皮为培养基,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活性。结果发现,菌株No. V3.4504的蛋白酶活性远大于几丁质酶活性(图3-A),蛋白酶在前6天一直呈现快速增长趋势,而几丁质酶则维持在一个较低的水平。d 6,蛋白酶活性达到最大值(33.946 U/g)时,是当天几丁质酶活性的16倍。6 d过后,蛋白酶活性降低,而几丁质酶活性从d 6开始却迅速增加,d 7其酶活性达到6.392 U/g,是d 5的3.5倍;菌株No. V3.4505的蛋白酶活性和几丁质酶活性变化趋势与前一菌株的相似(图3-B),但蛋白酶活性高峰期出现在d 4,是当天几丁质酶活性的5.5倍。其几丁质酶活也在d 6呈现增长趋势,d 8几丁质酶活性达到8.655 U/g,是d 5的2.9倍。

2.4 蜡蚧轮枝菌两菌株胞外蛋白酶的活性比较

以沙里院褐球蚧的表皮为培养基培养蜡蚧轮枝菌两个菌株,测定比较其胞外蛋白酶的活性变化。从表1可以看出,菌株No. V3.4504蛋白酶活性在d 1为15.255 U/g,其后d 2~6酶

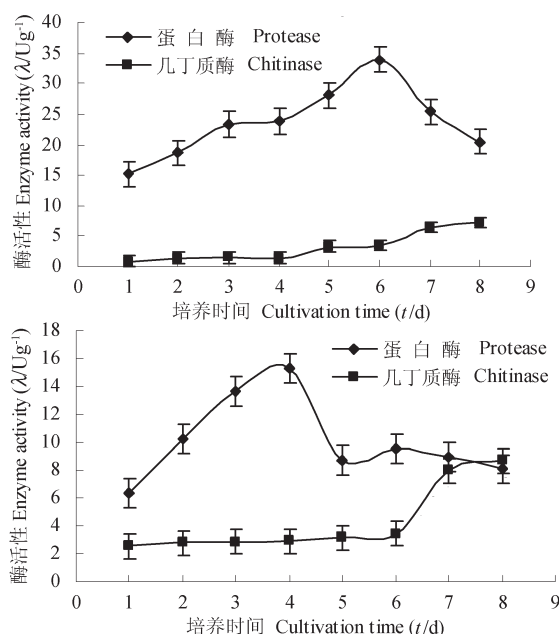


图3 蜡蚧轮枝菌No. V3.4504 (A)和No. V3.4505 (B)的蛋白酶活性与几丁质酶活性比较

Fig. 3 Comparison of protease and chitinase activities of strains No. V3.4504 (A) and No. V3.4505 (B) of *V. lecanii*

活性增长率分别是d 1的22.8%~122.5%,呈现逐日上升趋势,增长的差异达显著水平。在d 6蛋白酶的活性达到最大值,即33.946 U/g, d 7出现明显下降趋势, d 8降低至20.451 U/g。

菌株No. V3.4505蛋白酶的活性在前4天都呈现显著增长趋势,与d 1比较, d 2增长了62.0%,到d 4蛋白酶活性达到最大值,为15.322 U/g,是d 1的141.9%。此后出现降低, d 5蛋白酶活性为8.701 U/g,比前1天降低了43.2%,降低幅度差异达极显著水平。此后3 d呈现缓慢降低趋势,到d 8蛋白酶活性为8.063 U/g。

比较两个菌株蛋白酶活性的变化趋势,可以看出,菌株No. V3.4504蛋白酶的活性显著大于No. V3.4505蛋白酶的活性,当菌株No. V3.4505的蛋白酶活性在d 4达到最大值时,菌株No. V3.4504的蛋白酶活性还处于增长趋势,直到d 6才达到最大值。菌株No. V3.4504胞外蛋白酶的最大活性是No.

表1 蜡蚧轮枝菌两菌株在培养过程中蛋白酶活性的变化

Table 1 Protease activities of the two strains of *V. lecanii* during their cultivation

培养时间 Cultivation time (t/d)	菌株 Strain			菌株 Strain		
	蛋白酶活性 Protease activity ($\lambda/\text{U g}^{-1}$)	增长率 Increase rate	差异显著性 Significant difference ($P=T_{0.05}$)	蛋白酶活性 Protease activity ($\lambda/\text{U g}^{-1}$)	增长率 Increase rate	差异显著性 Significant difference ($P=T_{0.05}$)
1	15.255 $\pm$ 0.921	—	a	6.333 $\pm$ 0.912	—	a
2	18.734 $\pm$ 0.557	22.8%	b	10.258 $\pm$ 0.374	62.0%	b
3	23.336 $\pm$ 0.233	53.0%	c	13.623 $\pm$ 0.832	115.1%	c
4	23.870 $\pm$ 0.160	56.5%	c	15.322 $\pm$ 1.061	141.9%	c
5	28.081 $\pm$ 0.775	80.4%	d	8.701 $\pm$ 1.218	37.4%	ab
6	33.946 $\pm$ 1.612	122.5%	e	9.550 $\pm$ 0.914	50.8%	b
7	25.372 $\pm$ 1.424	66.3%	c	8.959 $\pm$ 1.293	41.5%	b
8	20.451 $\pm$ 0.873	34.1%	b	8.063 $\pm$ 0.755	27.3%	ab

表中蛋白酶活性数据是3次独立实验(各2个重复)结果的平均值(Mean $\pm$ SE),下同

The data of protease activity in the table are the means of three independent experiments (two replicates). The same below

表2 蜡蚧轮枝菌两菌株在培养过程中几丁质酶活性的变化
Table 2 Chitinase activities of the two strains of *V. lecanii* during their cultivation

培养时间 Cultivation time (t/d)	菌株 Strain					
	No. V3.4504			No. V3.4505		
	几丁质酶活性 Chitinase activity (λ /U g ⁻¹)	增长率 Increase rate	差异显著性 Significant difference ($P=T_{0.05}$)	几丁质酶活性 Chitinase activity (λ /U g ⁻¹)	增长率 Increase rate	差异显著性 Significant difference ($P=T_{0.05}$)
1	0.896±0.189	——	a	2.564±0.555	——	a
2	1.467±0.152	63.7%	a	2.804±0.941	9.3%	a
3	1.481±0.271	65.3%	a	2.871±0.186	11.9%	a
4	1.447±0.069	61.5%	a	2.884±0.202	12.5%	a
5	3.330±0.422	271.6%	b	3.119±0.171	21.6%	a
6	3.478±0.768	288.1%	b	3.450±0.512	34.5%	a
7	6.392±0.908	613.4%	c	7.944±0.531	211.8%	b
8	7.286±1.366	713.2 %	c	8.655±1.186	237.6%	b

V3.4505胞外蛋白酶最大活性的2倍。

2.5 蜡蚧轮枝菌两菌株几丁质酶的活性比较

在比较两菌株蛋白酶活性的同时,我们还测定比较了其胞外几丁质酶的活性变化。结果(表2)显示,菌株No. V3.4504的几丁质酶活性从d 1的0.896 U/g上升到d 8的7.286 U/g,其中前4天酶活性增长幅度较小,差异不显著。d 5和d 6出现明显增长,由d 1的0.896 U/g上升为3.330 U/g和3.478U/g。d 6后酶活性出现急剧增加,d 7和d 8几丁质酶活性上升为6.392 U/g和7.286U/g,与d 6的酶活性相比,增长幅度达极显著差异水平。菌株No. V3.4505的几丁质酶活性在d 1为2.564 U/g,在d 2出现增长,并持续低增长到d 4。d 5和d 6出现较明显的增加趋势,使酶活增加为3.450 U/g,比d 1增长了34.5%。d 7和d 8酶活力分别为7.940 U/g和8.655 U/g,与d 6之间具有显著差异。

3 讨论

微生物如病毒、细菌和原生动物侵染咀嚼式口器昆虫一般主要通过昆虫取食过程经口腔进入肠道,发挥致病作用。但蚧虫是刺吸式口器昆虫,它们以口器刺入植物组织吸取汁液的方式取食,这种取食方式使病原微生物不能从口器进入。而虫生真菌则可以通过孢子产生菌丝而直接穿透体壁进行感染,在蚧虫防治方面显示优势。

虫生真菌在侵染昆虫表皮的过程中,分生孢子在寄主体壁萌发形成菌丝。用蜡蚧轮枝菌的孢子悬浮液感染沙里院褐球蚧,染菌2 d后在虫体表面蜡粉稀薄的位置出现了菌丝,蜡粉多的部位没有菌丝,主要是因为蚧虫蜡的主要成分是长碳链化合物,包括直链和带支链或环状的脂肪醇、脂肪酸、醛、酮类或由它们组成的酯类化合物^[18],对孢子的萌发具有抑制作用。

研究已经发现,当菌丝遇到昆虫表皮便特化成附着胞,附着胞可分泌粘液,其主要成分为糖蛋白和N-乙酰半乳糖多糖,这些粘液可使菌丝和附着胞本身附着于寄主昆虫表面,并保护菌丝在穿透过程中不至于过度依赖自由水。附着胞在虫体表面寻找恰当的入侵位点,再在入侵位点长出侵染钉。附着胞还分泌一系列降解寄主体壁成分的胞外蛋白酶和几丁质酶等。Goette等认为,胞外酶由寄主表皮面上的附着胞和表皮内的侵染菌丝共同分泌^[19],St.Leger等报道胞外酶的产量与附着胞形成率一致^[20],均证明了附着胞与胞外酶密切

相关。这些胞外蛋白酶和几丁质酶分解蛋白质和几丁质,为虫生真菌提供C源和N源。我们以蚧虫表皮为培养基培养蜡蚧轮枝菌时,两菌株的蛋白酶在培养前期都呈现增长趋势,分别在d 4和d 6达到最大值,此后开始下降。与此对应的是几丁质酶活性在前4天都维持在相对低的水平,d 5和d 6出现增长,d 7和d 8增加幅度很大。对两个菌株胞外蛋白酶和几丁质酶酶活变化趋势的比较分析表明,两个菌株在入侵沙里院褐球蚧表皮过程中,蛋白酶和几丁质酶的作用顺序是相同的,首先由蛋白酶在前期发挥主要作用,降解了表皮中的蛋白质,使表皮中的几丁质暴露,从而诱导了几丁质酶的大量产生(几丁质酶是一种诱导酶),然后由几丁质酶将内表皮层的几丁质分解,帮助菌丝成功侵入体壁的细胞层,最后进入体腔。St. Leger在研究绿僵菌对烟草天蛾(*Manduca sexta*)的侵染过程中发现,蛋白酶总是在侵染的早期产生,而几丁质酶的大量产生和活性总是发生在穿透过程的后期,而在初期作用甚微^[21],我们的研究结果与其相似。

蛋白酶和几丁质酶活性变化趋势反映出其作用与蚧虫表皮结构有关。蚧虫表皮主要由上表皮、外表皮和内表皮组成,上表皮主要由疏水性的脂肪和碳水化合物组成,外表皮和内表皮由蛋白质和几丁质组成,几丁质和蛋白质之间共价结合以糖蛋白的形式存在,几丁质就是这种糖蛋白的一个辅基。该复合体有一个15~30条几丁质链组成微丝核心,蛋白质以螺旋方式包围微丝成鞘,组成一个六角形的亚单位。蜡蚧轮枝菌入侵蚧虫表皮的前期,由于表皮蛋白质嵌合在几丁质纤维中,在几丁质降解几丁质纤维之前必须先由蛋白酶起作用。随着表皮蛋白质的降解,几丁质纤维被暴露出来,从而诱导了几丁质酶的产生。Barreto在研究绿僵菌几丁质酶提纯时发现,几丁质酶的活性也受GlcNAc的双重调节,GlcNAc是几丁质酶分解几丁质的产物,也是昆虫表皮主成分之一,作为几丁质前体而存在,约占昆虫表皮的25%~40%,当GlcNAc的含量低时能诱导几丁质酶的活性,含量高时则能抑制几丁质酶的活性^[22]。我们的研究发现,在用沙里院褐球蚧的表皮作为培养基培养蜡蚧轮枝菌8 d的过程中,随着表皮蛋白质的降解,几丁质纤维被暴露出来,几丁质酶受到几丁质和lcNAc的共同诱导,在穿透表皮后期发挥重要作用。

比较两个菌株蛋白酶活性的变化趋势,发现No. V3.4504对蚧虫体壁的蛋白质分解力更强。根据蛋白酶活性作为虫生

真菌的毒力指标来看, 菌株No. V3.4504对沙里院褐球蚧具有更高的毒性. 比较两个菌株几丁质酶的活性数据, 可以看出它们有相似的变化趋势, 但是菌株No. V3.4505的几丁质酶活性比菌株No. V3.4504的大, 特别在前6天, 前者的绝对值都高于后者. 但从两菌株的增长率来看, No. V3.4504的增长率比菌株No. V3.4505的要大得多, 说明菌株No. V3.4504的胞外几丁质酶更容易受几丁质的诱导.

本研究对蜡蚧轮枝菌侵染沙里院褐球蚧过程中蛋白酶和几丁质酶的作用机制做了初步分析, 发现不同菌株之间两种酶活性的大小和变化是有差别的, 因此, 评价不同菌株的特性对筛选优势菌株用于蚧虫生物防治是十分必要的.

References

- Ben-Dov Y, Hodgson CJ. Soft scale insect their biology, natural enemies and control [7A]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1997. 3~27
- Rosen D. Armored scale insect their biology, natural enemies and control [4B]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1990. 3~16
- Fournier V, Brodeur J. Dose-response susceptibility of pest aphids (Homoptera: Aphididae) and their control on hydroponically grown lettuce with the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*, Azadirachtin and insecticidal soap. *Environ Entomol*, 2000, **29** (3): 568~578
- Wang LD, Huang J, You MS, Guan X, Liu B. Toxicity and feeding deterrence of crude toxin extracts of *Lecanicillium lecanii* (Hyphomycetes) against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J Appl Entomol*, 2005, **129** (1): 32~38
- Gindin G, Geschtovt NU, Raccach B. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different development stages of the silverleaf whitefly. *Bemisia Argentifolii Playtoparasitica*, 2000, **28** (3): 1~3
- Cavallazzi G, Prieto A, Ariza R. Evaluation of the entomopathogenic *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas in the control of the soft scale *Philephedra tuberculosa* Nakahara & Gill in the Guanabana (*Annona muricata*). *Agron Colombiana*, 1998, **15** (2): 106~111
- Rosso A, Magnano di San Lio G, Cacciola SO, Asero C. *Verticillium lecanii* as a possible control agent of citrus black scale in Sicily. Proceeding of the Sixth International Citrus Congress, Tel Aviv, Israel, March 6~11, 1988
- Yin FM (殷凤鸣), Chen QC (陈权才), Ye YH (叶燕华), Pan WY (潘务耀), Yu HB (余海滨), Ma HT (马辉腾), Zhang SH (张上洪). The research of *Verticillium lecanii* prevention and cure *Oracella acuta*. *For Sci & Technol* (林业科技通讯), 1996 (5): 15~18
- Yuan SY (袁盛勇), Kong Q (孔琼), Zhang H (张虹), Li ZY (李正跃), Chen B (陈斌), Zhu CY (朱春燕). Laboratory assessment of the virulence of *Verticillium lecanii* Viegas to *Trialeurodes vaporariorum* and *Iceryapurchasi maskeli*. *J South West China Norm Univ* (西南师范大学学报), 2007, **32** (1): 111~114
- Clarkson JM, Charnley AK. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol*, 1996, **4**: 197~203
- Charnley AK. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Wicklow D, Soderstrom M eds. *The Mycota IV, Environmental and Microbial Relationships*. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 1997. 185~201
- Smith RJ, Pekrul S, Grula EA. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J Invert Pathol*, 1981, **38**: 335~344
- St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *J Invert Pathol*, 1986, **48**: 85~95
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Exp Mycol*, 1988, **12**: 161~168
- Feng MG (冯明光). 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
- Huang XH (黄晓红), Chen QX (陈清西), Wang J (王君), Sha L (沙莉), Huang ZP (黄志鹏), Guan X (关雄). Effects of different organic solvents on the chitinase from *Bacillus thuringiensis*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (1): 71~73
- 郑国昌, 谷祝平. 生物显微技术. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1982. 93~95
- Xie YP (谢映平), Xue JL (薛皎亮), Zheng LY (郑乐怡). Wax Secretion of Soft Scale Insects and Their Ultrastructure & Chemical Composition. Beijing, China (北京): China Forestry Publishing House (中国林业出版社), 2006. 15~18
- Goettel MS, St. Leger RJ, Rizzo NW. Ultrastructural localization of guticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 2233~2239
- St. Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. Production of cuticle-degrading enzyme by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *J Gen Microbiol*, 1987, **133**: 1371~1382
- St. Leger RJ, Joshi MJ, Bidochka Rizzo NW, Roberts DW. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsin produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 1257~1264
- 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