

李保国,张丹丹,李瑞军,等.金龟子绿僵菌胞外蛋白酶活性与毒力的相关性[J].江苏农业科学,2016,44(1):166-167,219.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.047

# 金龟子绿僵菌胞外蛋白酶活性与毒力的相关性

李保国,张丹丹,李瑞军,刘廷辉

(河北农业大学植物保护学院,河北保定 071001)

**摘要:**为研究金龟子绿僵菌蛋白酶活性与毒力的关系,以黄粉虫为试虫测定金龟子绿僵菌的毒力,采用 Folin-酚试剂法对其胞外蛋白酶活性进行测定,并分析蛋白酶活性与毒力的关系。结果表明,不同菌株的蛋白酶活性差异较大,酶活性与毒力存在一定线性关系。胞外蛋白酶的活性可作为金龟子绿僵菌毒力判定的指标之一。

**关键词:**金龟子绿僵菌;胞外蛋白酶;Folin-酚试剂法;黄粉虫;毒力测定

**中图分类号:** S433.5    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0166-02

金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)是一种广泛存在的昆虫寄生真菌,其寄主有 200 多种<sup>[1]</sup>,且致病力强、持效期长、不易产生抗药性、对人畜无害,利用其开发微生物杀虫剂具有良好发展前景<sup>[2-3]</sup>。金龟子绿僵菌需要酶分解寄主昆虫的表皮,以进入昆虫体内完成侵染过程<sup>[4]</sup>。关于杀虫真菌胞外酶的研究较多,Kucera 等在昆虫体壁离体培养条件下首次发现蛋白酶的活性,并指出菌株的蛋白酶活力与其毒力存在关系<sup>[5-6]</sup>。Michael 等利用明胶作为唯一碳源、氮源,发现球孢白僵菌可在平板上分泌一种蛋白酶<sup>[7]</sup>,众多学者利用这一方法测定胞外蛋白酶含量。樊美珍等利用该方法,以马尾松毛虫作为试虫,测定球孢白僵菌胞外蛋白酶的产量与毒力的关系,证实了其具有相关性<sup>[8]</sup>。王刚对已有研究进行了系统性总结,发现球孢白僵菌的蛋白酶可作为参考毒力指标,虽具有一定可靠性,但不能夸大其作用,应谨慎使用<sup>[9]</sup>。冯光明对不同来源的 17 株球孢白僵菌进行研究发现,蛋白酶活性可作为菌株毒力判定的标准之一,但不能夸大其作用<sup>[10]</sup>。可见,胞外蛋白酶与其毒力判定存在一定关系,但由于所用试虫不同,测定胞外酶的方法也不同,因此结论具有一定差异。

在蛋白质的测定方面,Folin-酚试剂法比双缩脲法灵敏 100 倍、比茚三酮方法灵敏数倍,且操作简单易行,是研究蛋白质较为精准的检测方法<sup>[11]</sup>。黄粉虫(*Tenebrio molitor* L.)诱集法是一种经济、简单的土壤昆虫病原真菌分离方法<sup>[12]</sup>。本试验利用 Folin-酚试剂法测定金龟子绿僵菌的胞外蛋白酶活性,利用黄粉虫幼虫作为标准试虫进行毒力测定,探讨金龟子绿僵菌胞外蛋白酶活性与毒力的关系,以期建立标准方法,避免因酶测定方法和试虫的不同影响研究结论。

## 1 材料与方法

收稿日期:2015-01-09

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费;北方果树食心虫防控新技术研究与示范推广(编号:201103024)。

作者简介:李保国(1989—),男,河北唐山人,硕士,主要从事农业昆虫与害虫防治研究。E-mail:315490370@qq.com。

通信作者:李瑞军,博士,副教授,主要从事害虫生物防治及农业生态安全研究。E-mail:liruijun99@sina.com。

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株及试虫 供试菌株为金龟子绿僵菌菌株,由北方野外土壤中诱集分离得到并保存。试虫为黄粉虫(*Tenebrio molitor* L.),由笔者所在实验室饲养,挑选低龄幼虫进行毒力测定。

1.1.2 药品 吐温、PDA 培养基、SDA 培养基、酪氨酸、酪蛋白、Folin-酚试剂为生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

### 1.2 方法

1.2.1 孢子悬浮液的配制 配制体积分数为  $1 \times 10^8$  个/mL 的孢子悬浮液:将接种于 PDA 培养基的金龟子绿僵菌在  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  下恒温培养 10 d,刮取孢子置于研磨器中充分研磨,加入 0.05% 吐温-80 无菌水,倒入已灭菌烧杯中,涡旋振荡使其充分混匀。采用血球计数板计数,调整至指定体积分数。

1.2.2 粗酶液的制备 将各菌株  $1 \times 10^8$  个/mL 的孢子悬浮液按 1% 的量分别接入液体 SDA 培养基(100 mL 液体 SDA 培养基于 250 mL 三角瓶中),以加入 0.05% 吐温-80 无菌水的样品为对照,于  $25^\circ\text{C}$ 、150 r/min 在旋转式摇床中培养,按时取培养物并用滤纸过滤,利用滤液测定蛋白酶活性。

1.2.3 粗酶液蛋白酶含量的测定 以酪蛋白为底物,利用 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 值 8.5)配成 10 g/L 的酪蛋白溶液。取该溶液 1 mL 并添加待测酶液 1 mL,于  $37^\circ\text{C}$  反应 30 min,每个处理 3 次重复。采用 2 mL 0.4 mol/L 的三氯乙酸终止反应。过滤后采用 Folin-酚试剂进行检测,每管加入 400  $\mu\text{L}$  样品溶液、2 mL FolinAB 混合液(按 1:50 的比例配制),室温下静置 10 min 后,加入 200  $\mu\text{L}$  酚试剂并静置 30 min,在 650 nm 波长下测定吸光值。以每分钟催化分解生成 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸的酶量为 1 个活性单位(U/mL),用酪氨酸标准溶液制作标准曲线,从而得到不同菌株的胞外蛋白酶活性。

1.2.4 培养时间对金龟子绿僵菌胞外蛋白酶活性的影响 选取金龟子绿僵菌菌株 M11-8-7 和 M7-5-7,按上述方法培养 7 d,每天测定其胞外蛋白酶活性并记录。

1.2.5 不同菌株胞外蛋白酶活性的测定 选取 6 株金龟子绿僵菌,按上述方法培养 5 d,测定其胞外蛋白酶活性并记录。

1.2.6 金龟子绿僵菌对黄粉虫幼虫致病力的初步测定 将

接种于 PDA 培养基的金龟子绿僵菌菌种置于  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  恒温培养 10 d,刮取孢子置于研磨器中充分研磨,采用 0.05% 吐温-80 无菌水配制成体积分数为  $1 \times 10^8$  个/mL 的孢子悬浮液。用纱布包裹黄粉虫幼虫,在菌液中浸泡 3 s 后取出,对照组采用等量 0.05% 吐温-80 无菌水。每组设 3 个重复,每个重复 10 头试虫。在饲养条件下连续观察 10 d,每天记录试虫的死亡数,并采用 DPS 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 酪氨酸标准曲线

通过酪氨酸标准溶液绘制标准曲线(图 1),y 为吸光度  $D_{650\text{ nm}}$ ,x 为蛋白酶活性,以每分钟催化分解生成 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸的酶量为 1 个活性单位(U/mL)。标准曲线的线性方程为  $y = 0.011\ 3x + 0.083\ 6, r^2 = 0.983\ 5$ 。

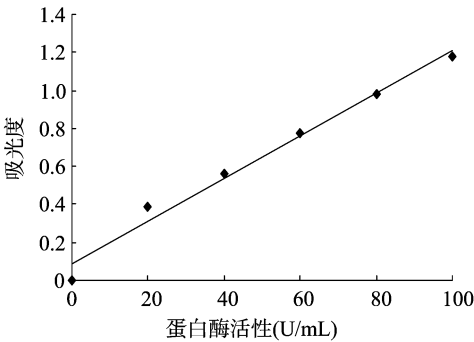


图1 酪氨酸溶液标准曲线

2.2 培养时间对胞外蛋白酶活性的影响

连续 7 d 测定金龟子绿僵菌 M11-8-7、M7-5-7 菌株的蛋白酶活性(图 2)。胞外蛋白酶活性在前几天呈增长趋势,于 5 d 达到最大值,之后有所下降;因此,测定酶活性与毒力的关系时,选用培养 5 d 的培养物。

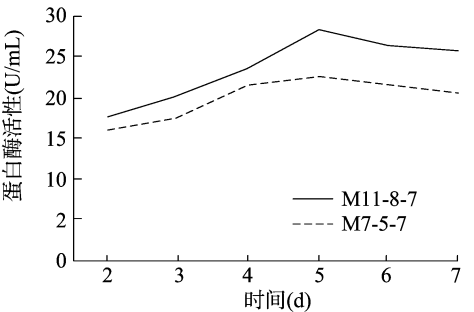


图2 金龟子绿僵菌分泌胞外蛋白酶的时间动态

2.3 6 株金龟子绿僵菌的蛋白酶活性和毒力

由酪氨酸标准曲线可得到 6 种菌株的蛋白酶活性,对其进行相关性分析。相关性分析结果(表 1)表明,不同菌株产生的蛋白酶活性具有显著差异。以黄粉虫作为试虫进行毒力测定,利用 DPS 软件分析数据。由表 2 可知,金龟子绿僵菌 M7-5-7、M8-5-83、M8-6-291 菌株的蛋白酶活性较弱,毒力较差;M7-10 菌株的蛋白酶活性强,毒力也相对较强。对表 2 数据进行相关性分析表明,金龟子绿僵菌的蛋白酶活性  $y_1$  与致死中时的自然对数  $x_1$  存在线性函数关系: $y = 47.79 - 12.19x, r^2 = 0.897\ 8$ 。可见,金龟子绿僵菌的蛋白酶

活性与毒力存在较强的线性相关性,可将蛋白酶活性作为判断菌株毒力强弱的指标。

表 1 不同金龟子绿僵菌菌株的蛋白酶活性显著性分析

菌株	蛋白酶活性 (U/mL)
M7-10	39.50 ± 0.27aA
M6-448	34.04 ± 2.47bB
M11-8-7	32.40 ± 0.24bB
M8-6-291	27.90 ± 0.25cC
M8-5-83	27.55 ± 0.56cC
M7-5-7	27.22 ± 0.55cC

注:数据后不同小写字母、大写字母分别表示差异显著 ( $P < 0.05$ )、极显著 ( $P < 0.01$ )。

表 2 金龟子绿僵菌的蛋白酶活性及其致死中时(LT<sub>50</sub>)、死亡率

菌株	蛋白酶活性 (U/mL)	LT <sub>50</sub> (d)	死亡率 (%)
M7-5-7	27.22 ± 0.55	5.77	66.67
M8-5-83	27.55 ± 0.56	5.69	70.00
M8-6-291	27.90 ± 0.25	4.53	100.00
M11-8-7	32.40 ± 0.24	3.06	100.00
M6-448	34.04 ± 2.47	2.91	100.00
M7-10	39.50 ± 0.27	2.36	100.00

3 结论与讨论

金龟子绿僵菌的侵染过程须破坏昆虫表皮,蛋白酶是破坏昆虫体壁的重要物质之一。昆虫表皮成分中含 60% ~ 80% 蛋白质<sup>[13]</sup>,杀虫真菌对蛋白质的分解成为其侵染昆虫的重要条件之一,因此蛋白酶的活性强弱是判定杀虫真菌侵染昆虫能力的重要指标。Folin-酚试剂检测酪氨酸比明胶-琼脂平板法、双缩脲法、紫外分光光度法等其他检测方法更加精确可靠,为检测杀虫真菌分泌的蛋白酶活性提供了良好平台<sup>[11]</sup>。黄粉虫是常用于诱集土壤金龟子绿僵菌的昆虫<sup>[12]</sup>,具有一定代表性,以黄粉虫作为试虫可更好地研究金龟子绿僵菌胞外蛋白酶活性与毒力的关系。

金龟子绿僵菌分泌胞外蛋白酶具有明显的时间动态,研究结果显示,培养 5 d 时 2 菌株的胞外蛋白酶活性最高,之后有所下降,这可能与培养基的营养含量有关。根据该结果选择在培养 5 d 时进行检测,以准确揭示菌株的胞外蛋白酶活性。然而,不同条件下、不同菌株分泌胞外蛋白酶的时间动态特性尚有待进一步研究。

蛋白酶活性与金龟子绿僵菌的侵染能力具有一定线性关系,若金龟子绿僵菌所产的胞外蛋白酶活性强,其毒力也相对较强;若胞外蛋白酶活性弱,其毒力也相对较弱。胞外蛋白酶活性不仅可作为球孢白僵菌毒力强弱的评价因子<sup>[14]</sup>,还可作为金龟子绿僵菌毒力评判的重要指标。由试验结果  $y = 47.79 - 12.19x, r^2 = 0.897\ 8$  可知,胞外蛋白酶活性与毒力的正相关性不高,表明影响毒力的因素很多,包括侵入过程中几丁质酶、脂酶等其他酶的作用<sup>[15-17]</sup>,以及侵入后更为复杂的毒理过程;因此,以酶的活性作为毒力指标时应持谨慎态度。刘智辉等认为胞外酶的活性应在一定条件下使用,或作为大量菌株初筛工作的参考指标<sup>[18]</sup>。

- [J]. 安徽农学通报, 2013, 19(20): 25-26.
- [6] 王 岚, 吴定军, 鲁道旺. 梵净山七叶一枝花总黄酮提取工艺的优化[J]. 南方农业学报, 2014, 45(4): 634-638.
- [7] 张旺凡, 沈素贞, 梁文斌, 等. 七叶一枝花种子萌发特性研究[J]. 中国野生植物资源, 2013, 32(5): 16-20.
- [8] 宋发军, 黄宗华. 七叶一枝花组织培养和种子萌发条件的研究[J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2013, 32(2): 51-54.
- [9] 蒙爱东, 闫志刚, 余丽莹, 等. 七叶一枝花种子无菌培养萌发观察[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 258-260.
- [10] 袁 晓, 袁 萍, 严海燕, 等. 野生珍稀药用植物七叶一枝花的成分含量分析[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(6): 575-577.
- [11] 夏侯国论, 王恩军, 范小娜. 微波消解-火焰原子吸收光谱法测定七叶一枝花中的微量元素[J]. 光谱实验室, 2009, 26(5): 1227-1229.
- [12] 刘艳辉, 杨 旋, 李九玲, 等. 七叶一枝花内生真菌 *Penicillium* sp. (No. 4) 聚酮类次级代谢产物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(4): 431-434, 493.
- [13] 刘艳辉, 冯紫薇, 罗 微, 等. 七叶一枝花内生真菌 *Penicillium* sp. (NO. 24) 次级代谢产物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(5): 585-589.
- [14] 田启建, 陈功锡, 刘 冰, 等. 人工栽培七叶一枝花的生物学特征及物候期研究[J]. 湖南农业科学, 2010(13): 18-20.
- [15] 孟繁蕴, 汪丽娅, 冯成强, 等. 滇重楼引种驯化研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(7): 147-149.
- [16] 张金渝, 虞 泓, 张时刚, 等. 滇重楼与华重楼的野生驯化和繁殖技术研究[J]. 西南农业学报, 2004, 17(3): 314-317.
- [17] 杨永红, 戴丽君, 严 君, 等. 滇重楼种子中氨基酸和元素的分析测定[J]. 中兽医医药杂志, 2009(2): 39-41.
- [18] 贾丽娟, 汪正祥, 雷 耘, 等. 不同基质对长柄水青冈种子出苗和幼苗生长的影响[J]. 生态科学, 2009, 28(6): 503-509.
- [19] 吴礼树. 土壤肥科学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [20] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [21] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1958.
- [22] 冯晓英, 黄建国, 袁 玲, 等. 有机无机肥配施对烤烟生理特性及经济性状的影响[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(11): 49-51.
- [23] 牟林春, 罗 勤, 蔡佩玲, 等. 重楼的栽培与利用[J]. 技术与市场, 2006(6): 34-35.
- [24] 罗付香, 杨世民, 袁继超, 等. 氮肥调控对川农麦1号灌浆期旗叶光合特性的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(8): 1639-1642.
- [25] 刘力宁, 满秀玲, 唐中华, 等. 不同沙土配比对约书亚树幼苗生理特征的影响[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(7): 25-29.
- [26] 徐守真, 陈明霞, 李明军, 等. 肥力水平对怀地黄脱毒苗生长发育和生理特性的影响[J]. 河南农业科学, 2013, 42(5): 136-140.
- [27] 李国英, 何 丹, 徐跃进. 影响红菜薹产量和品质因素的研究[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(2): 348-351.
- [28] 曾黎明, 李伏生, 陈 涛. 生物有机肥和石灰对木薯生理性状及生长的影响[J]. 广东农业科学, 2011(17): 1-3.
- [29] 张银丽, 李 杨, 李 东, 等. 不同栽培基质对榼藤幼苗期生长发育的影响[J]. 热带生物学报, 2012, 3(4): 365-368.
- [30] 郭水良, 方 芳. 入侵植物加拿大一枝黄花对环境的生理适应性研究[J]. 植物生态学报, 2003, 27(1): 47-52.

(上接第167页)

本研究方法是对此方面研究的一次尝试, 试验方法不同、相同菌株对不同试虫毒力的差异<sup>[19]</sup>均会影响试验结论。本研究采用Folin-酚试剂法, 以黄粉虫作为标准试虫, 统一金龟子绿僵菌胞外蛋白酶活性与毒力相关性的研究方法, 避免因试验方法、试虫的不同而产生不同结论。

#### 参考文献:

- [1] 田 甜, 李瑞军, 陆秀君, 等. 保定蝗区土壤绿僵菌对飞蝗高毒力菌株的筛选[J]. 植物保护, 2009, 35(5): 65-69.
- [2] 李卓棣, 胡正嘉. 微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 283-284.
- [3] 蒲蛰龙. 害虫生物防治[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 104-108.
- [4] McCoy C W, Burges H D. Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii* [M]//Microbial control of pests and plant diseases. New York: Academic Press, 1981: 499-512.
- [5] Kucera M. Protease from the fungus *Metarhizium ansopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae [J]. Invertebr Pathol, 1980, 35: 304-310.
- [6] St. Leger R J, Durrands P K, Charnley A K, et al. Role of extracellular chymo elas tase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta* [J]. Invertebr Pathol, 1988, 52(2): 285-293.
- [7] Michael J, Bidochka, Geogre G K, et al. Regulation of extraecellular protease in the enromopazhogenie fungus *B. bassiana* [J]. Experi Mycol, 1988, 12: 161-168.
- [8] 樊美珍, 胡锦涛, 李农昌, 等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶及其与毒力关系的研究[J]. 微生物学通报, 1994, 21(4): 202-206.
- [9] 王 刚. 球孢白僵菌胞外蛋白酶及几丁质酶的研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(13): 175-178.
- [10] 冯明光. 胞外蛋白酶和脂酶活性作为球孢白僵菌毒力指标的可靠性分析[J]. 微生物学报, 1998, 38(6): 461-467.
- [11] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. 福林酚试剂法测定蛋白质[J]. 食品与药品, 2011, 13(03): 147-151.
- [12] 贾春生, 由士江, 高文韬. 利用黄粉虫分离土壤昆虫病原真菌[J]. 昆虫知识, 2006, 43(2): 260-261, 280.
- [13] Hepburn H R. Structure of the integument [C]//Kerkut G A, Gilbert L I. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford: Pergamon Press, 1985: 1-58.
- [14] 唐晓庆, 李增智. 球孢白僵菌胞外蛋白酶产生水平与毒力关系[J]. 安徽农业大学学报, 1996, 23(3): 293-296.
- [15] 林华峰, 李连德, 李增智, 等. 白僵菌胞外蛋白酶的测定及其与酯酶型的关系[J]. 中国生物防治, 1997, 13(1): 33-37.
- [16] Chamley A K. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review [C]//Anderson J M. Invertebrate - microbial interactions. London: Cambridge University Press, 1984: 229-270.
- [17] 石晓珍, 王 敏, 黄华平, 等. 绿僵菌几丁质酶活性及其对椰心叶甲毒力的相关性分析[J]. 广西农业科学, 2008, 39(3): 313-316.
- [18] 刘智辉, 陈守文, 郭志红, 等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶和几丁质酶活性与对亚洲玉米螟毒力的相关性分析[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 364-368.
- [19] 马丽娟. 优良绿僵菌菌株的筛选及应用性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.