

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*

冯 明 光

(浙江农业大学生物科学系 杭州 310029)

摘 要 通过测定 17 株不同来源球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)的胞外蛋白酶活性(PU, $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)和脂酶活性(LU, $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)及其对血黑蝗(*Melanoplus sanguinipes*)的毒力,分析用酶活性作为毒力指标的可靠性。结果表明,菌株间毒力和酶活性差异较大,LT₅₀的变化范围为 5.27~16.89d, PU 和 LU 分别为 $0.47 \sim 3.37 \times 10^{-2}$ 和 0.00~56.75。将 PU 与 LU 分别对接种后各日累计死亡率及 LT₅₀进行回归分析,发现各菌株 PU 与其毒力相关显著,但 LU 却与毒力相关不显著。对接种后 7d 的死亡率,PU 可表达其变异的 67%,也是最大表达率。因此,PU 可作为大量菌株初筛的参考性毒力指标,但应谨慎使用,不能以 PU 测定完全取代常规的毒力测定。脂酶活性不宜作为所试菌种的毒力参考指标。

关键词 球孢白僵菌,胞外蛋白酶和脂酶,毒力相关性,血黑蝗

分类号 Q939.9

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)是重要的杀虫真菌^[1],其新产品已在美国注册并投放市场。近 10 年来,国内外学者一直在寻找某种能够替代在活虫上进行毒力测定的快捷方法,即以酶的活性作为毒力指标的方法^[2~6],以加快杀虫真菌的研究步伐。

杀虫真菌一般通过芽管穿透主要由蛋白质、几丁质和脂类物质组成的昆虫体壁而感染寄主^[1],在病理学上这一过程常与体壁结构物分解酶的活动有关^[7],而球孢白僵菌等几种主要杀虫性丝孢真菌常具有产生胞外蛋白酶、几丁质酶、脂酶等昆虫体壁降解酶的能力^[8~14]。这些酶的活性测定可借助于普通的生物化学方法,省时省力。因此,选择测定菌株某些特征性体壁降解酶的活性作为其毒力高低的指标,似乎既有理论基础,又有可行性。然而,有些报道误解实验结果,或夸大酶活性与毒力相关性的作用。另一些报道仅凭简单比较就得出肯定或否定的结论,缺乏必要的统计学依据。作者测定了 17 株球孢白僵菌的胞外蛋白酶和脂酶的活性及其对血黑蝗(*Melanoplus sanguinipes*)的毒力,试图通过统计分析评价上述两种体壁降解酶作为毒力指标的可靠性。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

17 株菌中的 8 株系作者自感病死亡的麦二叉蚜(*Schizaphis graminum*)和俄罗斯双尾

* 国家杰出青年科学基金、国家自然科学基金和浙江省自然科学基金资助。

收稿日期:1997-07-02

蚜(*Diuraphis noxia*)上分离获得(SG 8601, SG 8701, SG 8702, SG 8801, DN 8803, DN 8804, DN 8805, DN8806)^[13]。其余菌株来自美国(ATCC)、加拿大(DAOM)和前苏联(USSR)的专业菌种保藏机构,寄主为鳞翅目和鞘翅目昆虫,也有加拿大萨斯卡川大学生物杀虫剂研究室 Khachatourians G. G.提供的菌株(GK)和土壤分离物(ATCC 44860, DAOM 144746)。

1.2 毒力测定

各菌株在SDAY平板上室温(21°~25℃)培养7~10d,收集分生孢子粉配制成悬液,浓度标准化为 10^7 孢子/ml,供接种用。

作为试虫的血黑蝗实验种群用大麦苗和麦麸在网笼中饲养,24°~28℃,光周期为16:8(L:D)。孵化后10d的若虫(2龄末或3龄初)用于接种,从笼内随机取虫,按每株菌30头左右成批处理,并设不接菌处理作为对照。接种时,每批试虫置于网袋内,在培养皿内30ml的孢子悬液中浸渍2s,在滤纸上快速吸干。然后,将每批试虫置于高20cm、直径14cm的塑料罐内,罐口用网纱罩住,每天供给新鲜大麦叶作为饲料,在21°~25℃下饲养,逐日观察记载死亡数。新鲜虫尸及时移出,并保湿培养以确诊死因。

1.3 胞外蛋白酶测定

各菌株胞外蛋白酶通过摇床振荡培养而获得。培养液含1%明胶(W/V), NaCl、 K_2HPO_4 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 三种基盐各0.3g/L。各组分溶入pH7.0的0.2mol/L磷酸盐缓冲液,120℃蒸汽灭菌20min。50ml三角瓶装培养液20ml,以2ml孢子悬液(10^8 孢子/ml)接种,然后在27℃下振荡(150r/min)培养4d。培养物经过滤,滤液存于-20℃冰箱作酶活性测定用,滤出物在37℃下过夜烘干并称重。

用于胞外蛋白酶活性测定的基质液为1.0mmol/L氮-琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺,该化合物10mg加入16ml二甲基亚砷中即成所需基质液。参照Bidochka和Khachatourians的方法测定^[6],每只10ml玻璃试管内装0.1mol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.5)1.8ml和培养物滤液100 μ l,再加入100 μ l基质液混匀,在37℃下摇床振荡(180r/min)培养10min,然后移出冰浴1min。最后,从每只试管中取3个100 μ l液样,在分光光度计410nm(OD_{410})下分别测定吸收率。每株菌重复3次。混合液中基质被利用 $1.0\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 即为1个标准蛋白酶活性单位(PU),它与在相应培养条件下光吸收率的变化有关。

1.4 胞外脂酶测定

各菌株含胞外脂酶培养滤液的获得方法与蛋白酶相同,但培养液系0.01% MES(2-[N-吗啉代]乙磺酸)-NaOH缓冲液(pH6.0)加入1%蛋白胨和2%葵花籽油。从各菌株的5d振荡培养物中取4个4ml样,分别用滤纸过滤,滤液存于-20℃冰箱作酶测定,菌丝滤出物干燥称重。

脂酶活性的测定参照Hegedus和Khachatourians^[9]的方法。基质液为10ml含30mg对硝基棕榈酸的异丙醇与90ml含207mg脱氧胆酸钠和100mg阿拉伯胶的0.05mol/L Sorensen磷酸缓冲液的混合液。测定时,基质液2ml在37℃下水浴预热后与100 μ l滤液混合均匀,再在37℃下培养10min。最后在 OD_{410} 下测定混合物的光吸收率。在脂酶作用每小时从1ml混合液的基质中释放出1 μ mol对硝基,即为1个标准脂酶活性单位(LU,记为

1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), 恰等于在 OD_{410} 时吸收率变化 0.001。

所有酶测试剂均购自美国 Sigma 化学公司。

1.5 数据分析

试虫死亡率观察数据用几值分析法^[16]计算各菌株对试虫的致死中时 LT_{50} 。用各菌株的 PU 和 LU 测定值分别对试虫的死亡率或 LT_{50} 进行回归分析, 根据模型中斜率参数 (b) 的 t 检验显著性和确定系数 (r^2) 的大小, 分析自变量对因变量的相关性与因变量变异的被表达程度, 从而评价 PU 和 LU 作为毒力指标的意义。

2 结果和讨论

2.1 毒力

不同菌株对试虫的致死率见图 1 所示。试虫一般接种后 4d 始见死亡。菌株间的毒力

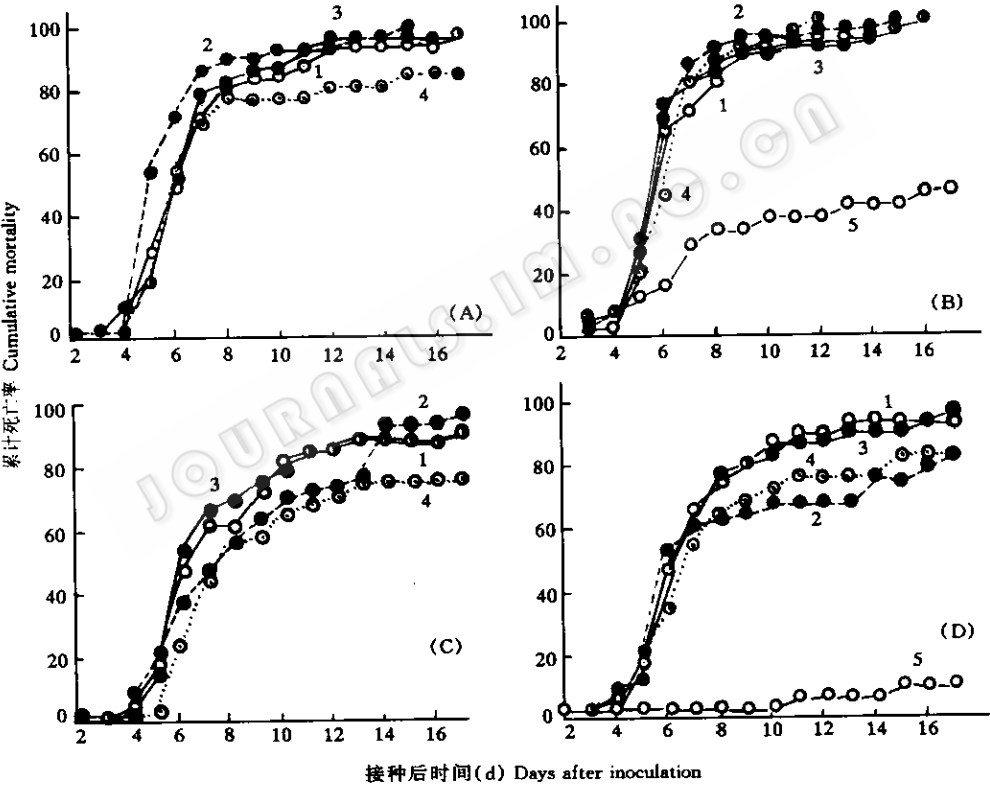


图 1 接种球孢白僵菌 17 个不同菌株分生孢子悬液 (10^7 孢子 / ml) 后血黑蝇的累计死亡率

Fig. 1 The cumulative mortality of *M. sanguinipes* after topical inoculation of the conidial suspensions (10^7 conidia / ml) of 17 *B. bassiana* isolates

- A. 1. SG 8601; 2. SG 8701; 3. SG 8702; 4. SG 8801;
- B. 1. DN 8803; 2. DN 8804; 3. DN 8805; 4. DN 8806; 5. USSR 2553;
- C. 1. GK 2016; 2. GK 2051; 3. ATCC 44860; 4. DAOM 71453;
- D. 1. DAOM 195005; 2. DAOM 144746; 3. DAOM 210569; 4. USSR 2274; 5. Control.

差异可从死亡曲线的延伸角度和高度直观看出,如麦蚜菌株引起的死亡主要发生在接种后 4~7d,至 10d 死亡率已基本稳定;而毒力较差的菌株在接种 10d 后死亡仍在增长,如典型的弱毒菌株 USSR 2533。试验中被处理试虫多半能正常蜕皮,且蜕皮后仍发病死亡,但也有部分试虫蜕皮困难或死于蜕皮阶段。观察结束时仍未死亡的个体均已发育为成虫。对照处理也有 3 头试虫死亡。除对照外所有处理的虫尸菌在保湿条件下从体表长出白僵菌,但少数菌株致死的虫尸外生长物比较稀疏且产孢少,如 GK 2051、USSR 2274、DAOM 210569 和 ATCC 44860。总之,不同寄主和地域来源的菌株虽然表观毒力差异较大,但都对试虫具有明显的致病致死能力。

根据几值分析,各菌株的毒力(表 1)差异较大,LT₅₀的平均估计值为 5.27~16.89d。麦蚜菌株中有 6 个菌株的 LT₅₀不超过 6d,表现出很强的毒力。另外 2 个麦蚜菌株和 DAOM 195005、DAOM 210569、ATCC 44860 及 GK 2016 的 LT₅₀在 6~7d,其他菌株的 LT₅₀在 7.5d 以上,USSR 2533 达 16.99d。

2.2 蛋白酶与脂酶活性

胞外蛋白酶和脂酶的测定结果(表 1)表明,不同菌株间两种酶的活性差异甚大。相对而言,8 个麦蚜菌株的酶活性水平较高且变幅较小。GK 2016 和 GK 2051 曾被报道是富蛋

表1 不同球孢白僵菌菌株对血黑蝇的LT₅₀及其它们的胞外蛋白酶与脂酶活性

Table 1 The LT₅₀'s of various *B. bassiana* isolates against *M. sanguinipes* and the activities of their extracellular protease and lipase

菌 株 Isolate	LT ₅₀		蛋白酶活性		脂酶活性	
	均值95%置信限		干物±SD*	PU±SD,×10 ⁻²	干物±SD*	LU±SD
	mean fiducial limit		dry mass	protease unit	dry mass	lipase unit
	(d)	(d)	mg/ml	μmol · ml ⁻¹ · min ⁻¹	(mg/ml)	μmol · ml ⁻¹ · h ⁻¹
SG 8601	6.17	(5.69~6.70)	2.84±0.41	2.84±0.62	2.30±0.21	29.10±3.47
SG 8701	5.27	(4.84~5.73)	2.61±0.53	3.37±0.47	3.60±1.34	51.45±18.92
SG 8702	5.84	(5.39~6.31)	3.15±0.45	3.31±0.61	2.75±0.74	36.70±10.68
SG 8801	6.74	(6.09~7.46)	3.26±0.19	2.34±0.89	2.50±0.50	28.50±7.36
DN 8803	6.08	(5.66~6.53)	2.84±0.42	2.65±0.88	1.95±0.04	15.35±0.81
DN 8804	5.64	(5.26~6.06)	3.16±0.09	3.25±0.60	3.30±1.20	56.60±20.51
DN 8805	5.78	(5.38~6.20)	3.51±0.30	2.44±0.93	4.60±1.34	15.50±4.74
DN 8806	5.82	(5.44~6.23)	3.39±0.27	3.21±0.57	2.90±0.42	56.75±1.10
GK 2016	6.84	(6.36~7.37)	2.87±0.24	1.30±0.36	3.93±0.80	4.09±1.05
GK 2051	7.45	(6.92~8.03)	2.75±0.53	0.47±0.09	2.16±0.13	4.38±1.03
ATCC 44860	6.53	(6.02~7.08)	2.19±0.15	2.19±0.05	1.83±0.30	42.44±4.92
DAOM 71453	8.44	(7.65~9.32)	4.65±1.19	1.97±0.10	3.53±0.63	53.44±16.44
DAOM 195005	6.32	(5.85~6.84)	4.63±0.71	0.75±0.26	2.30±0.30	8.17±2.06
DAOM 144746	7.59	(6.81~8.46)	2.78±0.62	1.45±0.52	0.96±0.20	0.00±0.00
DAOM 210569	6.63	(6.17~7.12)	5.95±1.03	1.49±0.10	4.14±1.24	3.65±0.64
USSR 2274	7.59	(6.91~8.33)	1.94±0.41	1.89±0.14	5.82±1.02	30.55±4.83
USSR 2533	16.89	(13.01~21.77)	4.08±1.40	0.28±0.04	1.74±0.21	0.60±0.52

* 指液体培养的过滤物(菌丝)干燥后重量The weight of dry fungal mass in liquid culture.

白酶但贫脂酶的菌株^[6],在本项研究中其脂酶的低水平得到证实(仅 $4.09\sim 4.38\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$),但蛋白酶活性水平在所有菌株中却是较低或极低的。另外,土壤分离株 DAOM 144746 未能检测到脂酶的活性,其蛋白酶活性也偏低。

2.3 酶活性与毒力的相关性

根据回归分析结果(表 2),不同菌株蛋白酶的活性水平与试虫接种处理后 5~17d 的累计死亡率均显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)正相关,与 LT_{50} 显著负相关,表明蛋白酶确与毒力有关联。与此相反,脂酶活性仅与接种后 7d 和 8d 的累计死亡率相关显著($P<0.05$),但与接种后其它时日的死亡率或 LT_{50} 均无显著相关性($P>0.05$),显示脂酶的活性与各菌株的毒力关联甚小或缺乏关联。

表 2 球孢白僵菌不同菌株胞外蛋白酶及脂酶活性与血黑蝇接种后不同时间累计死亡率及 LT_{50} 的回归分析

Table 2 Correlation of extracellular protease and lipase activity of 17 *B. bassiana* isolates to the cumulative mortality of *M. sanguinipes* after inoculation and to the LT_{50} 's

接种天数 Days after inoculation	PU与死亡率及 LT_{50} 回归参数				LU与死亡率及 LT_{50} 回归参数			
	Regression for PU vs mortality or LT_{50}				Regression for LU vs mortality or LT_{50}			
	<i>b</i>	<i>t</i>	P	r^2	<i>b</i>	<i>t</i>	P	r^2
5	0.0488	2.0423	0.0591	0.2176	0.0011	0.8446	0.4116	0.0454
6	0.0942	3.0311	0.0084	0.3799	0.0014	0.7863	0.4440	0.0396
7	0.1244	5.5373	0.0001	0.6715	0.0035	2.1331	0.0498	0.2327
8	0.1179	5.3191	0.0001	0.6535	0.0035	2.2672	0.0386	0.2552
9	0.1157	4.4988	0.0004	0.5743	0.0031	1.8131	0.0899	0.1798
10	0.0988	3.8063	0.0017	0.4913	0.0027	1.7166	0.1066	0.1642
11	0.0995	3.5610	0.0028	0.4581	0.0028	1.6845	0.1128	0.1591
12	0.1106	4.0888	0.0010	0.5271	0.0034	2.0445	0.0589	0.2179
13	0.1003	3.6775	0.0022	0.4741	0.0032	2.0236	0.0612	0.2144
14	0.0819	2.7518	0.0148	0.3355	0.0024	1.4905	0.1568	0.1290
15	0.0887	3.0539	0.0080	0.3833	0.0027	1.6353	0.1228	0.1513
16	0.0833	3.0005	0.0090	0.3751	0.0022	1.3895	0.1850	0.1140
17	0.0777	2.6688	0.0175	0.3220	0.0018	1.1040	0.2870	0.0752
LT_{50}	-1.6317	-3.0222	0.0086	0.3785	-0.0492	-1.6370	0.1224	0.1516

由于接种后 7d 和 8d 的试虫死亡率均与蛋白酶和脂酶显著相关,因此有必要进行两种酶对上述死亡率观察值分别进行多元回归分析,以明确两种酶对死亡率综合影响。多元模型中包括了蛋白酶、脂酶及二者间的互作效应三项。结果显示,仅蛋白酶项在模型中达到显著水平(7d 死亡率: $t = 3.5771$, $P = 0.0034$; 8d 死亡率: $t = 3.3349$, $P = 0.0054$),脂酶项效应不显著(7d 死亡率: $t = 1.6793$, $P = 0.1170$; 8d 死亡率: $t = 0.8332$, $P = 0.4198$),脂酶与蛋白酶的互作效应项也不显著(7d 死亡率: $t = 1.0183$, $P = 0.3271$; 8d 死亡率: $t = 0.3158$, $P = 0.0053$)。

2.4 关于酶活性作为毒力指标的评价及讨论

多元回归分析基本否定了用两种酶的活性指标建立球孢白僵菌毒力指标经验关系的努力。主要原因是脂酶的毒力相关性很差,不能表达所试菌种的毒力变异。仅就相关性而言,蛋白酶的作用是重要的,可以在一定程度上表达白僵菌的毒力变异。但是,这种程度

是有限的。表2中所列PU与接种后试虫死亡率或 LT_{50} 线性回归模型的确定系数(r^2)定量地描述了蛋白酶表达毒力的程度。对接种后7d的死亡率, $r^2 = 0.67$,即蛋白酶能表达该日死亡率变异的67%,也是最大值。在7d前, r^2 呈迅速递增趋势,而在7d后 r^2 呈缓慢递减趋势。对代表毒力综合指标的 LT_{50} ,蛋白酶仅表达了38%的变异($r^2 = 0.3785$)。因此,即使与毒力显著相关的蛋白酶活性指标,也不能夸大它作为毒力指标的作用。根据上述分析,作者认为蛋白酶活性测定可以作为初筛菌种的参考性毒力指标的依据,而不能完全替代常规的生物测定方法。该指标可在较大程度上反映试虫接种后7d的死亡率。

白僵菌对寄主的潜伏期一般为4d左右^[1],相关研究^[18]及本研究所用的17株菌均表现如此(图1)。接种后4~7d是试虫死亡率急剧增长的时期,7d后死亡率增长趋缓,对于强毒菌株,死亡率基本稳定下来。胞外蛋白酶作用于寄主的主要阶段应是在病菌穿透寄主体壁的过程中即潜伏期,蛋白酶活性强的菌株理论上穿透体壁的时间短,成功侵染率高。这是蛋白酶活性作为白僵菌参考毒力指标的生物学基础,也是其与接种后7d死亡率相关最显著的直接原因。

蛋白酶仅是昆虫体壁结构物降解酶系之一。本研究结果否定了脂酶在白僵菌侵染过程中的主导作用。几丁质酶是另一体壁结构物降解酶系^[7],但其作为毒力指标的作用仍有争议。有报道称几丁质酶活性与毒力相关^[10~11,19],也有报道称几丁质酶与菌株毒力的关系不如蛋白酶明显^[14], Jackson等^[17]甚至发现一个几丁质酶贫乏的蜡蚧轮枝孢(*Vertecillium lecanii*)突变菌株同野生型菌株毒力相当。除上述基本酶系外,与体壁结构物降解有关的其他衍生酶系还包括肽酶、酯酶等^[11~13]。但是,作为有用的定量参考指标,作者认为目前仅有蛋白酶相对可靠。

蛋白酶作为毒力指标的相对可靠性主要表现为它与接种后的试虫死亡率始终显著,但其表现的变异随接种后的时间区间而异,最高时(接种后第7天)也只有67%。因此,用蛋白酶活性作为白僵菌或其他杀虫真菌的毒力指标时必须持谨慎态度,应当有条件地使用。作者认为该方法适用于大量菌株的初筛工作。

致谢 本项研究工作在加拿大萨斯卡川大学生物杀虫剂研究室完成(Bioinsecticide Research Laboratory, University of Saskatchewan, Canada), Khachatourians G G提供部分菌株, Falkowski J E和 Tong K L给予技术帮助,一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Feng M G, Poprawski T J, Khachatourians G G. *Biocontrol Sci Technol*, 1994, 4:3~34.
- [2] 唐晓庆,李增智. 安徽农业大学学报, 1996, 23: 279~284.
- [3] 胡景江,樊美珍. 安徽农业大学学报, 1996, 23: 273~278.
- [4] 樊美珍,胡景江. 安徽农业大学学报, 1996, 23: 260~266.
- [5] 张永安,谈迎春,陈昌洁. 林业科技通讯, 1987, (12): 14~16.
- [6] Bidochka M J, Khachatourians G G. *J Invertebr Pathol*, 1990, 56: 362~370.
- [7] Charnley A K. Physiological Aspects of Destructive Pathogenesis in Insects by Fungi: A Speculative Review. In: Anderson J M et al ed. *Invertebrate-Microbial Interactions*. London: Cambridge University Press, 1984. 229~270.
- [8] Bidochka M J, Khachatourians G G. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 1679~1684.

- [9] Hegedus D D, Khachatourians G G. *Biotechnol Lett*, 1988, **10**:637~642.
- [10] El-Sayed G N, Coudron T A, Ignoffo C M *et al.* *J Invertebr pathol*, 1989, **54**:394~403.
- [11] Gupta S C, Leathers T D, El-Sayed G N *et al.* *Exp Mycol*, 1992, **16**:132~137.
- [12] St. Leger R J, Charnley A K, Cooper R M. *J Invertebr pathol*, 1986, **48**:85~95.
- [13] St. Leger R J, Cooper R M, Charnley A K. *J Invertebr Pathol*, 1986, **47**:167~177.
- [14] St. Leger R J, Cooper R M, Charnley A K. *J Invertebr Pathol*, 1991, **58**:415~426.
- [15] Feng M G, Johnson J B, Kish L P. *Environ Entomol*, 1990, **19**:1534~1542.
- [16] Finney D J. *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge:Cambridge University Press, 1971. 1~333.
- [17] Jackson C W, Heale J B, Hall R A. *Ann Appl Biol*, 1985, **106**:39~48.
- [18] 冯明光, 唐启义, 胡国成等. 应用基础与工程科学学报, 1996, **4**: 22~33.
- [19] 张爱文, 刘维真, 邓春生等. 生物防治通报, 1990, **6**: 161~164.

RELIABILITY OF EXTRACELLULAR PROTEASE AND LIPASE ACTIVITIES OF *BEAUVERIA BASSIANA* ISOLATES USED AS THEIR VIRULENCE INDICES

Feng Mingguang

(Department of Biological Sciences, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract The extracellular protease and lipase activities of 17 *Beauveria bassiana* isolates from different hosts and countries were evaluated for the reliability for the indices of their virulence to the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Virulence assay of each isolate included about 30 10-d-old grasshoppers receiving topical inoculation with the suspension of 10^7 conidia / ml. In the assays of the enzymes, *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide and *p*-nitrophenyl palmitate were used as a substrate to measure the activities of protease (3 replicates) and lipase (4 replicates) in the filtrates of gelatin-based and sunflower oil-based liquid cultures of each isolate, respectively. Varying among the isolates assayed, the estimates of LT_{50} 's, protease units (PU), and lipase units (LU) were 5.27~16.89 d, $0.47 \sim 3.37 \times 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, and $0.00 \sim 56.75 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. Regression analysis revealed that PU was significantly ($P < 0.01$) correlated to the daily cumulative mortality of *M. sanguinipes* 5~17 d after inoculation and the LT_{50} 's whereas LU had little correlation to either the mortalities or the LT_{50} 's ($P > 0.10$). Based on the determination coefficients (r^2) from the regressions, PU alone interpreted at most 67% of the variation in the mortality 7d after inoculation but less than 50% in most of the days considered and only 38% in LT_{50} 's. Thus, the author suggested that PU could be used as virulence index only for early-stage selection of candidate isolates in large quantity and could not entirely replace conventional virulence assay method that remains most reliable.

Key words *Beauveria bassiana*, Extracellular protease and lipase activities, Virulence correlation, *Melanoplus sanguinipes*