

## 昆虫病原真菌对日本龟蜡蚧蜡分泌物的降解作用

张志娟, 谢映平\*, 薛皎亮, 樊金华

山西大学生命科学学院, 太原 030006

**摘要:** 【目的】为了研究昆虫病原真菌感染蚧虫过程中对其蜡分泌物的降解作用。【方法】本文选择3种虫生真菌的4个菌株即, 蜡蚧霉 *Lecaniciliium lecanii* 的菌株 V3.4504 和 V3.4505、球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌株 FDB01 和绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 菌株 TSL06, 以日本龟蜡蚧 *Ceroplastes japonicus* Green (昆虫纲: 半翅目: 蚧总科) 雌成虫的蜡分泌物作为无机盐培养液中的唯一碳源, 研究各菌株在该无机盐培养液中的生长情况、酶活变化和对蜡分泌物的降解作用。【结果】在上述培养液中, 4株病原真菌都能以日本龟蜡蚧的蜡分泌物作为其营养碳源, 进行生长繁殖, 产生酶类物质, 对蜡质造成降解。菌株 V3.4504 和 V3.4505 在无机盐培养液中多以芽管的形态存在, 而菌株 FDB01 和 TSL06 多以附着胞的形式存在; 在7天的培养过程中, 菌株 V3.4504、V3.4505、FDB01、TSL06 的脂肪酶活性最高值分别为  $(0.128 \pm 0.017)$  U/mL、 $(0.056 \pm 0.002)$  U/mL、 $(0.124 \pm 0.011)$  U/mL、 $(0.149 \pm 0.005)$  U/mL, 不同菌株之间的脂肪酶活性有显著差异; 4菌株脱氢酶活性分别为  $(0.075 \pm 0.003)$  U/mL、 $(0.074 \pm 0.003)$  U/mL、 $(0.061 \pm 0.04)$  U/mL、 $(0.066 \pm 0.002)$  U/mL, 它们之间的差异没有达到显著水平; 4菌株对蜡分泌物的降解率分别为  $(18.20 \pm 0.019)\%$ 、 $(11.00 \pm 0.011)\%$ 、 $(15.4 \pm 0.017)\%$ 、 $(23.10 \pm 0.031)\%$ ; 在菌的作用下, 蜡分泌物的结构变得松散, 表面出现许多小孔洞, 并有白色附着物。用扫描电镜观察到了菌丝在蜡质上的附着和穿刺。【结论】昆虫病原真菌可以降解日本龟蜡蚧蜡分泌物的化学成分(主要是长链脂肪酸等多种长碳链化合物以及组成“内蜜露”的多种糖类和氨基酸)作为自己的营养碳源, 并使蜡分泌物的物理结构发生改变, 这是病菌打破蜡壳屏障, 成功入侵蚧虫的关键原因。菌株分泌的脂肪酶和脱氢酶参与了降解作用, 其中脂肪酶发挥了更为关键的作用。4菌株中对蜡质的降解率依次为 TSL06 > V3.4504 > FDB01 > V3.4505。

**关键词:** 日本龟蜡蚧, 昆虫病原真菌, 蜡质, 降解, 脂肪酶, 脱氢酶

**中图分类号:** Q938      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013)05-0444-11

蚧虫属于昆虫纲 Insecta 半翅目 Hemiptera 蚧总科 Coccoidea, 全世界记录 7800 余种, 是农林、果树和花卉的重要害虫。日本龟蜡蚧 *Ceroplastes japonicus* Green 是蚧虫的典型代表, 寄主植物达 150 多种。它的最大特点是体壁具有多种泌蜡腺体, 能

分泌大量蜡质, 在虫体表面形成一层厚蜡壳, 保护虫体免受外界不利因子的侵袭和化学农药的伤害, 造成防治上的困难<sup>[1]</sup>。利用昆虫病原真菌感染害虫使其致病死亡, 是害虫生物防治的重要途径。研究已知病原真菌感染昆虫主要通过体壁入侵, 但蚧虫

**基金项目:** 国家自然科学基金(31070584); 山西省自然科学基金(2010011042-4); 高等学校博士学科点专项科研基金(20101401110008)

\* 通信作者。Tel: +86-351-7018092; Fax: +86-351-7018092; E-mail: xieyingping@eyou.com

**作者简介:** 张志娟(1988-), 女, 河南汝州人, 硕士研究生, 主要从事虫生真菌方面的研究。

**收稿日期:** 2012-11-26; **修回日期:** 2013-02-09

有蜡壳的保护在自然界中病原菌相对较少, 目前记录最重要的是蜡蚧霉 *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann Gams & Zare), 它属于子囊菌门 Ascomycota, 粪菌纲 Sordariomycetes, 肉座菌目 Hypocreales, 麦角菌科 Clavicipitaceas<sup>[2]</sup>, 是一种地理分布比较广泛的蚧虫病原真菌。此菌最早由 Nivter 于 1861 年在锡兰发现寄生咖啡蜡蚧 *Lecanii coffeae*, 但是, 目前蜡蚧霉仍主要用于防治蚜虫、粉虱和螨类, 在蚧虫上的应用却很少, 这与蚧虫体表具有厚蜡壳的保护作用有直接关系。因此, 研究病原真菌对蚧虫蜡壳的降解作用, 不仅可以揭示病原真菌如何克服蜡壳障碍而接触虫体的体壁, 而且在筛选高致病性菌株方面具有重要意义。但这方面的研究在国内外都还没有报道。

为了开发蜡蚧霉作为生物制剂用于蚧虫的生物防治, 我们实验室已经研究了蜡蚧霉感染日本龟蜡蚧后的组织病理变化<sup>[3]</sup>和蜡蚧霉入侵沙里院褐球蚧 *Rhodococcus sariuoni* Borchsenius 表皮过程中蛋白酶和几丁质酶的作用<sup>[4]</sup>, 但是关于病原真菌对蜡壳的降解作用还有没研究。研究已知蚧虫分泌蜡质的主要成分包括蜡、烃类、树脂类或萜类、色素和“内蜜露”<sup>[5]</sup>。日本龟蜡蚧雌成虫蜡壳具有多种化学成分, 包括长链脂肪酸、芳环类化合物、萜烯类化合物, 其中长链脂肪酸主要有直链饱和酸 (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub>-烷酸)、支链饱和酸 (C<sub>15</sub>) 和不饱和的 C<sub>18</sub>-烯酸脂肪酸<sup>[6]</sup>。病原真菌在穿透蜡壳过程中除了机械作用以外, 更需要分泌相关的酶类, 以降解蜡壳的化学组分, 破坏其物理结构, 才能到达体壁, 进行感染。

近年来, 已经从油井和石油污染的土壤中分离到一些假单胞细菌和酵母菌等微生物, 发现这些微生物可以产生脱氢酶活化石油烃的氢原子, 并传递给特定的受氢体, 可以实现石油烃的氧化和转化; 产生脂肪酶 (EC3. 1. 1. 3) 催化天然底物油脂水解, 生成脂肪酸、甘油和甘油单酯或二酯。这在石油污染土壤的生物修复和提高油井的出油率方面具有重要意义。一些报道指出, 生物修复受污染土壤过程中, 细菌代谢产生的脱氢酶活性与土壤中石油烃类的衰减量有密切的相关性<sup>[7-8]</sup>。Kashmiri 等 (2009) 从石油污染的土壤中分离出绿色木霉, 在以烃类为唯一碳源培养时, 发现绿色木霉的脂肪酶活性高达 7.3 U/mL<sup>[9]</sup>。

鉴于微生物可以产生脂肪酶和脱氢酶降解长碳

链的脂肪酸和烃类物质, 结合蚧虫蜡壳的化学成分特点, 本文选择昆虫病原真菌的 3 个菌种 4 个菌株, 即从蚧虫上分离的蜡蚧霉菌株 V3. 4504、从褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stal) 分离的蜡蚧霉菌株 V3. 4505 菌株、从帕克阿扁叶蜂幼虫 *Acantholyda parki* Shin Oharab&Byun 分离的球孢白僵菌 FDB01 菌株、从桃小食心虫幼虫 *Carposina sasakii* (Matsmura) 上分离的绿僵菌 TSL06 菌株, 研究它们在以日本龟蜡蚧雌成虫蜡壳作为唯一营养碳源条件下, 菌株的生长状况、脂肪酶和脱氢酶的酶活变化、对蜡质的降解率, 以及蜡质被降解后的形态变化, 为昆虫病原真菌打破蜡壳障碍, 成功入侵蚧虫提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 本研究采用我们实验室已有的 4 株昆虫病原真菌, 其中从蚧虫上分离的蜡蚧霉菌株 V3. 4504、从褐飞虱分离的蜡蚧霉菌株 V3. 4505、从帕克阿扁叶蜂幼虫分离的球孢白僵菌菌株 FDB01、从桃小食心虫幼虫上分离的绿僵菌菌株 TSL06。将 4 菌株以 PDA 培养基扩大培养备用。

**菌株分生孢子菌悬浮液:** 将 4 株病原真菌分别接种于 PDA 平板, 倒置培养, 25℃ 恒温箱中培养 10 天, 前 4 天培养为无光照条件, 以利于孢子萌发和菌丝的生长, 后 6 天光照交替培养 (L:D = 12:12), 以促进分生孢子的形成。培养完成后, 将获得的分生孢子用 0.1% 吐温 Tween-80 无菌水洗脱, 在光学显微镜 (OLYMPUS BX51) 下以血球计数板检测分生孢子浓度, 并将孢子浓度调整为  $2 \times 10^7$  孢子/mL 的悬浮液备用。

**1.1.2 蚧虫:** 研究采用日本龟蜡蚧雌成虫, 于 2011 年采自山西省运城市稷山县柿树上。采集时用枝剪将带有蚧虫的枝条剪下, 带回实验室备用。

**蚧虫蜡分泌物:** 将采集的柿树虫枝用蒸馏水反复清洗 2-3 次, 用解剖针从枝条上将日本龟蜡蚧的虫体剥下, 置电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9075) 内 28℃ 下烘干。然后将日本龟蜡蚧放入烧杯中, 加入氯仿, 用玻璃棒搅拌, 使虫体表面的蜡分泌物溶于氯仿, 用 2 层纱布过滤除去虫体, 将滤液置通风橱中让氯仿自然挥发后, 得到蚧虫蜡物质, 为蜡黄色半透明

固体,具有一定粘性。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**对硝基棕榈酸(Sigma-Aldrich CO. LLC.);脱氧胆酸钠(Sigma-Aldrich CO. LLC.);阿拉伯胶;TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮);三苯基甲苯;;三氯乙酸(天津科密欧化工有限公司);光学显微镜 OLYMPUS BX51(Olympus CO.);照相机 OLYMPUS C5050Z(Olympus CO.);扫描电镜 JSM-840(JEOL Ltd. Japan);冷冻离心机 Eppendorf Centrifuge 5804R(Eppendorf AG);电热恒温水浴锅-HHS(上海博讯实业有限公司);多功能酶标仪 Spectra Max M5(Molecular Devices CO.);体视显微镜 OLYMPUS SZ-ST(Olympus CO.)。

## 1.2 含蚘虫蜡质的无机盐培养基制备、接种和取样

分别称取 0.4 g 左右的蜡分泌物,加入 50 mL 无机盐培养基。自然 pH 值,121℃ 高压灭菌 30 min。无机盐培养基配方(潘学芳等,2002):NaCl 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025%、 $\text{NaNO}_3$  0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1%。

将制备好的分生孢子菌悬液按 5% 的接种量接种于含日本龟蜡蚘蜡质的无机盐培养基中,对照组按同样的比例接入 0.1% 的 Tween-80 无菌水溶液。每处理重复 3 次。30℃ (预实验 25℃ 和 30℃ 时 30℃ 条件下孢子生长状态更好)下 175 r/min 空气恒温摇床(GYROMA 767)培养 7 天,每天取样。

## 1.3 病原菌孢子浓度、形态、生长曲线的测定

在光学显微镜下以血球计数板检测分生孢子浓度,绘制真菌生长曲线;并用相机拍照记录真菌孢子形态的变化。

## 1.4 粗酶液的制备,及脂肪酶和脱氢酶活性的测定

将摇床培养每天所取样品用冷冻离心机 4℃ 下  $17829 \times g$  离心 20 min。上清液为含有脂肪酶的粗酶液,下层沉淀用蒸馏水洗涤后,用一定量的蒸馏水混匀为含有脱氢酶的粗酶液。

脂肪酶活性的测定:参照 Walter(2005)的方法略作改进<sup>[10]</sup>。基质液为 10 mL 含 30 mg 对硝基棕榈酸的异丙醇与 90 mL 含 207 mg 脱氧胆酸钠和 100 mg 阿拉伯胶的 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液的混合物。测定时,基质液 50  $\mu\text{L}$  在 37℃ 水浴锅中预热 10 min,然后与 5  $\mu\text{L}$  的酶液混合均匀,37℃ 再次水浴 20 min,然后立即向反应液中加入 75  $\mu\text{L}$  0.05 mol/L 的三氯乙酸混合均匀,放置 5 min 终止反应,再加入 80  $\mu\text{L}$  0.05 mol/L NaOH 调 pH 值与反应

前一致。最后用多功能酶标仪在 410 nm 处测定反应物的吸光值。根据标准曲线计算酶活,以每分钟催化分解脂肪生成 1  $\mu\text{g}$  硝酸苯胺的酶量为一个酶活单位 U。

脱氢酶活性测定:参照杨乐(2010)的方法并稍作改动<sup>[11]</sup>。将含有脱氢酶的粗酶液用无菌水配成菌悬液,分别吸取各菌悬液 0.2 mL, Tris-HCl 缓冲溶液 0.2 mL, TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮)标准溶液 0.1 mL 加入 2 mL 离心管中(每株菌重复 3 次),置 37℃ 水浴锅中充分反应显色 1 h 后,向各组试管中加入 0.05 mL HCHO 终止反应;立即向各离心管中加入 0.5 mL 氯仿进行萃取,空气恒温摇床 200 r/min 下震荡 10 min,放置片刻后用移液枪吸取 200  $\mu\text{L}$  萃取液到酶标板中,最后用多功能酶标仪在 485 nm 下测定反应物的吸光度值。根据标准曲线计算酶活,以每分钟催化分解 TTC 生成 1  $\mu\text{g}$  TF(三苯基甲苯)的酶量为一个酶活单位 U。

## 1.5 病原真菌对蚘虫活虫体的致死效果和对蚘虫蜡质降解效果

对蚘虫的致死率:将上述制备的 4 株昆虫病原真菌的菌悬液用侵染法接种到日本龟蜡蚘活虫体上,然后置于无菌的培养皿中(直径 20 cm),  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 10\%$  相对湿度下培养 15 天,观察日本龟蜡蚘虫体感染情况,计算致死率。每株菌株 3 个重复,每个重复 60 头蚘虫,对照用 0.1% 的吐温-80 无菌水做同样处理。致死率计算公式:  $M = (T1 - T2) / 60 \times 100\%$ ,其中 T1 为菌株处理的虫体 15 天死亡的个数, T2 为对照死亡的个数, M 为致死率。

蜡质的降解率:将加入无机盐培养液中的蜡质重量记为 W1。摇床培养 7 天后,从菌液中过滤出蜡质,用清水反复洗涤,将粘在蜡质上的菌丝洗掉,置烘箱内干燥,然后称重,恒重后记为 W2。对照组蜡质在摇床培养前称重为 W3,培养后称重,恒重后记为 W4。根据公式:  $D = [(W1 - W2) - (W3 - W4)] / W1 \times 100\%$ ,计算蚘虫虫体和蜡质的降解率。

降解前后蜡质形态变化的体视显微镜观察:分别选取降解前后的蚘虫蜡质样本置于培养皿中,体视显微镜下观察蜡质的形态特征,并用相机拍照,比较蜡质降解前后其物理结构的变化。

扫描电镜观察:蚘虫蜡质降解前后形态特征的扫描电镜观察技术采用 Liu 等(2009)的方法<sup>[3]</sup>。将

降解后的蜡质置于样品台上，真空条件下喷金 5-7 min。扫描电镜下观察蚧虫蜡质降解后的形态超微结构的变化。扫描电镜加速电压为15 kv，并用相机(Canon EOS 350D)拍照。

## 2 结果和分析

### 2.1 4 菌株降解蚧虫蜡质过程中孢子萌发和浓度的变化

试验结果显示，在含有日本龟蜡蚧蜡质的无机盐培养液中接种菌株后，连续培养 7 天，4 个菌株的分生孢子都可以萌发生长。菌株 V3.4504 在培养 1 天后，分生孢子从两端萌发为芽管，此后 2-7 天孢子向一端萌发为菌丝，菌丝顶部出现 1 个次生孢子，龙雁华等(2004) 将其称为具长芽管的孢子(图 1-A) [13]；菌株 V3.4505 孢子形态变化与菌株 NO.V3.4504 相似，培养 1 天后孢子向两端萌发为芽管，以后 6 天多以菌丝顶部出现次生孢子(即具长芽管的孢子)存在(图 1-B)；菌株 FDB01 培养 1 天后孢子萌发，出现比较短的芽管，生长 2 天后芽管顶部产

生 2-3 个次生分生孢子(产孢结构)，次生分生孢子脱落后成熟为分生孢子，分生孢子继续萌发为芽管，依次循环(图 1-C)；菌株 TSL06 培养 1 天后出现孢子向一端萌发为较长的芽管，前 3 天多以具长芽管的孢子存在，培养 4 天后多以芽管末端的次生小分生孢子脱落后成熟为分生孢子的形式存在(图 1-D)。

4 个菌株在 7 天的培养过程中，孢子(包括菌丝顶端的孢子和分生孢子)浓度变化如图 2 所示：菌株 V3.4504 在培养 2 天后，孢子浓度为  $(2.1 \pm 0.15) \times 10^6$  个/mL，此后升高，在第 6 天达到最大值为  $(4.72 \pm 0.076) \times 10^6$  个/mL，第 7 天后降低；菌株 V3.4505 也是在 2 天后，孢子浓度为  $(1.63 \pm 0.126) \times 10^6$  个/mL，然后孢子浓度一直升高，在 5 天达到最高值  $(3.97 \pm 0.126) \times 10^6$  个/mL，之后降低；菌株 FDB01 的孢子浓度前 4 天一直处于升高趋势，第 4 天达到最大值  $(4.83 \pm 0.076) \times 10^6$  个/mL，然后开始降低；菌株 TSL06 的孢子浓度从第 1-7 天内一直都处于升高趋势，在第 7 天后达到最大值  $(4.52 \pm 0.0764) \times 10^6$  个/mL。(在上述计算中次生分生小孢子由于个体小而没有计数在内)。

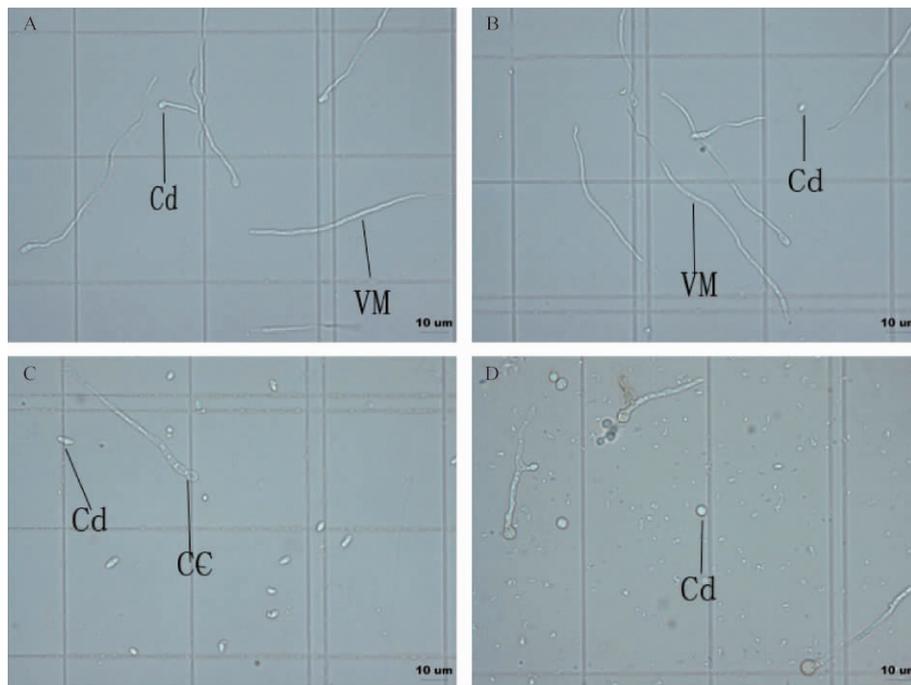


图 1. 4 菌株在降解蚧虫蜡质过程第 4 天的孢子形态

Figure 1. Spore morphology of the four strains in decomposing wax secreted by *Ceroplastes japonicus*. A: strain V3.4504, B: strain V3.4505, C: strain FDB01, D: strain TSL06. The characteristics of conidium (Cd), vegetative (VM), and conidiogenous cells (CC) of these strains in decomposing wax in the mineral medium for 4 days.

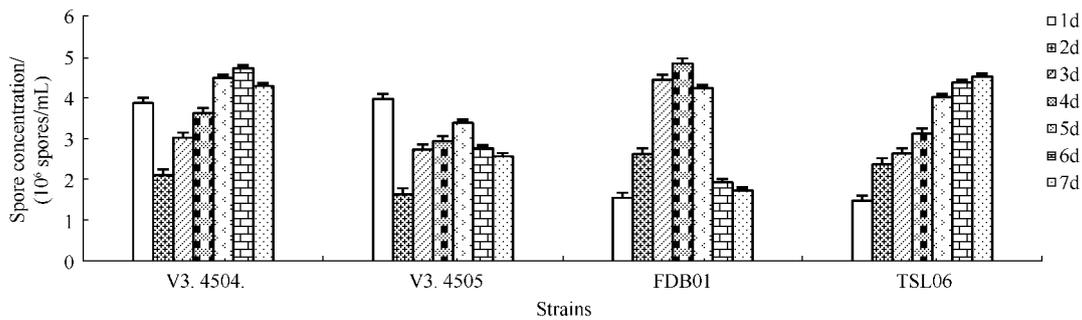


图 2. 4 菌株降解蚱虫蜡分泌物过程中孢子浓度的变化

Figure 2. Spore concentration change of the four strains in decomposing wax secreted by *Ceroplastes japonicas*.

## 2.2 4 菌株降解蚱虫蜡质过程中脂肪酶活性的变化

在降解蚱虫蜡质过程中,4 菌株的脂肪酶活性表现出不同的变化趋势(图 3)。图 3 展示出 4 菌株在 7 天内脂肪酶的活性变化,菌株 V3.4504 的脂肪酶活性在 2 天后就达到最大值,  $0.128 \pm 0.00165$  U/mL,此后逐天降低,在 6 天酶活性最小;与菌株 V3.4504 相比,菌株 V3.4505 的脂肪酶活性要低的多,尽管它的活性也是在 2 天达到最大值,但酶活值仅为  $0.057 \pm 0.002$  U/mL,随后降低,在第 4-7 天中都处于较低的状态,酶活性在  $0.020 - 0.027$  U/mL 之间;菌株 FDB01 的脂肪酶活性与前两个菌株的变化趋势都不同,它在 1-5 天内都呈现逐天上升趋势,且酶活性都比较高,第 5 天酶活达到最大值,  $0.115 \pm 0.017$  U/mL,第 6 天稍有下降;菌株 TSL06 的脂肪酶活性在 7 天内基本处于逐渐升高趋势,只是在第 3 天酶活性稍低,第 4-7 天都是逐天升高,第 7 天达到最大值,  $0.149 \pm$

$0.005$  U/mL。

4 菌株的脂肪酶在 7 天内的最大活性值依次为 TSL06 ( $0.149 \pm 0.005$  U/mL) > V3.4504 ( $0.128 \pm 0.0017$  U/mL) > FDB01 ( $0.115 \pm 0.017$  U/mL) > V3.4505 ( $0.057 \pm 0.002$  U/mL); 4 菌株的脂肪酶活性在 7 天的酶活累积值依次为 TSL06 ( $0.682 \pm 0.028$  U/mL) > FDB01 ( $0.498 \pm 0.030$  U/mL) > V3.4504 ( $0.374 \pm 0.033$  U/mL) > V3.4505 ( $0.202 \pm 0.006$  U/mL)。采用 SPSS 软件分析 4 菌株的脂肪酶活性:比较 4 菌株的脂肪酶活性最大值,其范围在  $0.056 - 0.149$  U/mL 之间,发现菌株 V3.4504 和 FDB01 的最大脂肪酶活性之间差异不显著,菌株 V3.4505 的最大脂肪酶活性与其它 3 菌株之间达到显著差异性水平;菌株 TSL06 的最大脂肪酶活性也与其它 3 菌株之间达到显著差异性水平。比较 4 菌株的脂肪酶活性累积值,其范围在  $0.202 - 0.682$  U/mL 之间,发现 1 菌株与其它 3 菌株的累积脂肪酶活性都达到显著差异性水平。

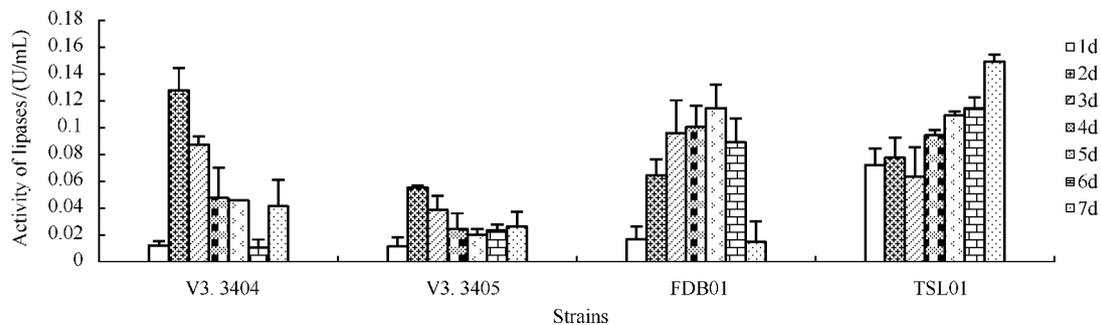


图 3. 4 菌株降解蚱虫蜡质过程中脂肪酶活性变化

Figure 3. Change of lipase activity of the four strains in decomposing wax secreted by *Ceroplastes japonicas*.

## 2.3 4 株病原真菌降解蚱虫蜡质过程中脱氢酶活性的变化

图 4 展示 4 菌株在降解蚱虫蜡质过程中脱氢酶

活性的变化趋势。菌株 V3.4504 的脱氢酶活性在 2 天就升到其最大值  $0.075 \pm 0.003$  U/mL,第 3 天仍保持较高水平,然后降低,在 4-7 天处于相似的酶

活水平; 菌株 V3.4505 的脱氢酶活性变化趋势与 V3.4504 略有不同, 表现在前 3 天均为上升趋势, 在第 3 天酶活达到最大值  $0.074 \pm 0.003$  U/mL, 然后降低, 在 4-7 天处于相似的酶活水平; 菌株 FDB01 的脱氢酶活性在 3 天为最大值  $0.061 \pm 0.004$  U/mL, 而第 5 天为最低值, 其余几天处于中等活性水平; 菌株 TSL06 的脱氢酶活性变化与前 3 菌株都不一样, 它在前 6 天都处于中等酶活性水平, 在第 7 天升高明显, 达到最大值  $0.066 \pm 0.002$  U/mL。

4 菌株的脱氢酶在 7 天内的最大活性值依次为 V3.4504 ( $0.075 \pm 0.003$  U/mL) > V3.4505 ( $0.074 \pm 0.002$  U/mL) > TSL06 ( $0.066 \pm 0.002$  U/mL) > FDB01 ( $0.061 \pm 0.004$  U/mL); 4 菌株的脱氢酶活性在 7 天的酶活累积值依次为 V3.4504 ( $0.370 \pm$

$0.007$  U/mL) > FDB01 ( $0.338 \pm 0.009$  U/mL) > V3.4505 ( $0.332 \pm 0.019$  U/mL) > TSL06 ( $0.318 \pm 0.008$  U/mL)。通过用 SPSS 软件分析菌株之间的脱氢酶活性差异显著性, 结果发现: 4 菌株的脱氢酶活性最大值, 其范围在  $0.075 - 0.061$  U/mL 之间, 菌株 V3.4504 和 V3.4505 的最大脱氢酶活性之间没有显著差异, 菌株 FDB01 和 TSL06 的最大脱氢酶活性没有显著差异, 蜡蚧霉 2 菌株与 FDB01 和 TSL06 菌株的最大脱氢酶活性之间达到显著差异性水平。4 菌株的脱氢酶活性累积值, 其范围在  $0.0318 - 0.370$  U/mL, 菌株 V3.4504 与其它 3 菌株之间的累积脂肪酶活性有显著差异性, 菌株 V3.4505、FDB01、TSL06 之间的脱氢酶累积活性没有显著性差异。

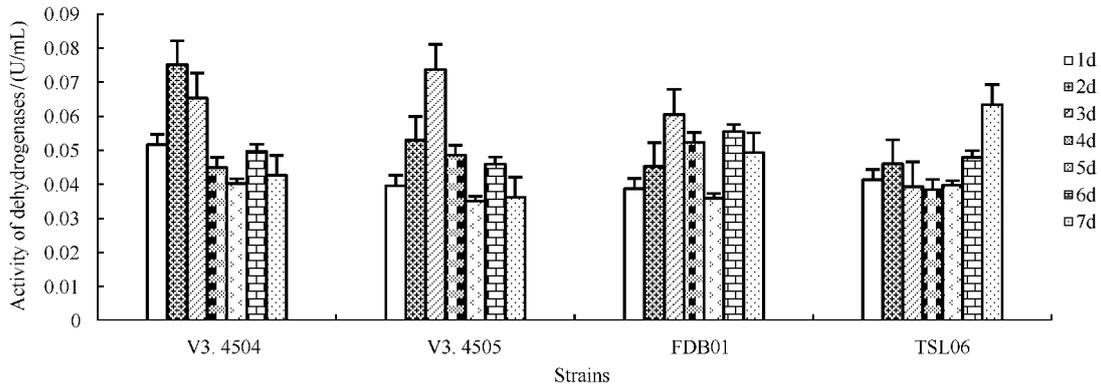


图 4. 4 菌株降解蚧虫蜡质过程中脱氢酶活性变化

Figure 4. Change of dehydrogenase activity of the four strains in decomposing wax secreted by *Ceroplastes japonicas*.

#### 2.4 4 菌株对蚧虫蜡质的降解

日本龟蜡蚧虫体染菌 15 天后, 4 菌株对蚧虫虫体的致死率分别为 TSL06 ( $70.56 \pm 0.04\%$ ) > V3.4504 ( $68.33 \pm 0.06\%$ ) > FDB01 ( $67.22 \pm 0.07\%$ ) > V3.4505 ( $65.00 \pm 0.05\%$ )。

蜡质降解后的外观特征(图 5): 体视显微镜观察显示, 经过菌株连续 7 天的培养, 在无机盐培养液中的蚧虫蜡质在形态结构上发生了明显变化。降解前的蚧虫蜡质(图 5-A)的结构致密均匀, 其中有黏性的内蜜露, 有光泽, 类似软膏状。在无机盐培养液中的不接入菌种, 作为对照, 同样培养 7 天后, 其中的蚧虫蜡质只是颜色发生稍许变化, 但结构依然紧密(图 5-B); 而在接菌处理组, 培养 7 天后, 营养液中的蚧虫蜡质结构变得酥脆, 表面和内部都有很多细小的孔洞和凹坑, 同时有一些白色附着物(图 5-C 和图 5-D)。

扫描电镜观察显示, 对照组蜡质表面呈网状分布, 但是结构依然比较致密(5-E)。在真菌降解的蜡质表面观察到许多菌丝附着, 一些菌丝已经刺破蜡质表面, 进入内部(5-F); 降解后的蜡质形成很多孔洞, 蜡丝暴露成网状, 更有利于菌丝从缝隙中入侵(5-G); 降解后蜡质中部分质量较轻的白色组分上浮, 聚集附着在蜡块表面(5-H)。这些说明真菌在降解蚧虫蜡质的过程中既有酶的作用也有菌丝的机械作用。

蜡质的降解率: 蚧虫蜡质在无机盐培养液中经过真菌连续 7 天降解, 通过称重法, 计算得出 4 菌株对蜡质的降解率依次为: TSL06 的  $23.10 \pm 0.031\%$  > V3.4504 的  $18.20 \pm 0.019\%$  > FDB01 的  $15.4 \pm 0.017\%$  > V3.4505 的  $11.00 \pm 0.011\%$ 。通过用 SPSS 软件分析菌株之间的差异显著性, 结果显示, 降解率处于中间的两个菌株 V3.4504 和 FDB01

之间没有显著差异,降解率最大的菌株 TSL06 与其它 3 菌株之间的差异都达到显著水平,降解率最小

的菌株 V3.4505 和其它 3 菌株之间的差异也达到显著水平。

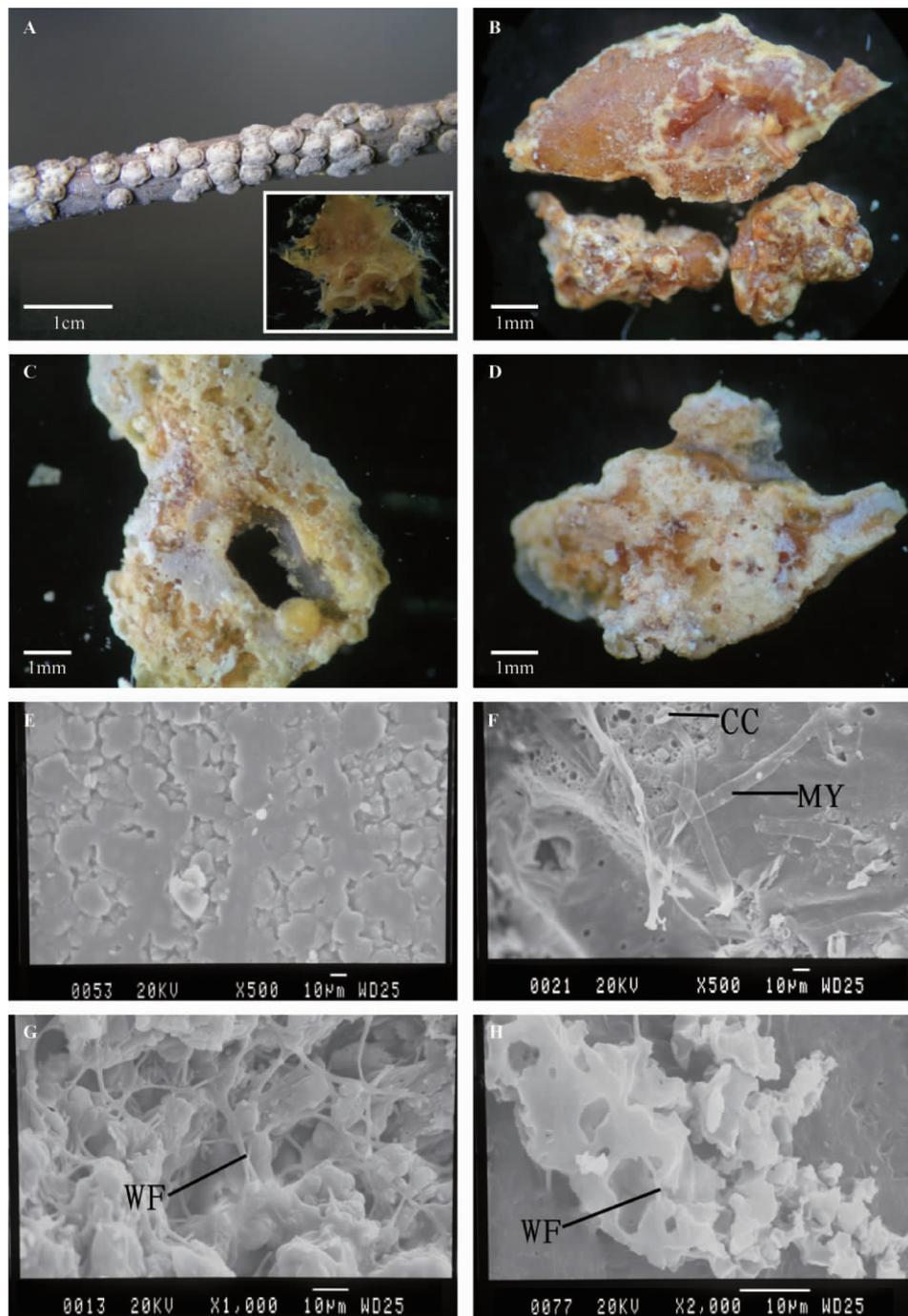


图 5. 蚘虫蜡质降解前后的形态特征变化

Figure 5. Appearance changes of wax before and after decomposed by the 4 strains. A: Appearance characteristics of wax before decomposed; B: Appearance characteristics of wax in the mineral medium without the 4 strains for 7 days; C and D: The appearance characteristics of wax after decomposed by the 4 strains. E-H: Photographs of wax substances observed using scanning electron microscope, E: The surface features of wax in the control group; F: In the treatment groups with fungus, the mycelium (MY) and conidiogenous cells (CC) adhered on the surface of wax; G: The appearance of wax decomposed by fungus showing many holes and wax filaments uncovered; H: The white substance adhered on the surface of wax that actually was certain components isolated from the wax complex.

## 2.5 4 菌株的脂肪酶和脱氢酶活性与对蚧虫蜡质降解率的关系

用上述测定的 4 菌株的脂肪酶和脱氢酶活性与它们对蚧虫蜡质的降解率作直线回归, 发现 4 菌株对蚧虫蜡质的降解率与最大脂肪酶活性之间的回归方程为  $Y = 1.2078x + 0.0340$ , 相关系数  $R^2 = 0.9014$ ; 与脂肪酶累积活性之间的回归方程为  $Y = 0.2222x + 0.0717$ , 相关系数  $R^2 = 0.7866$ , 说明 4 菌株的最大脂肪酶活性与其对蚧虫蜡质的降解率成显著的直线相关性。同样用 4 菌株对蚧虫蜡质的降解率与最大脱氢酶和累积脂肪酶活性做直线回归运算, 分别得到回归方程  $Y = -2.9496 + 0.3706 (R^2 = 0.1789)$  和  $Y = -0.3864x + 0.3002 (R^2 = 0.0289)$ , 说明 4 菌株对蚧虫的蜡质降解率与最大和累积脱氢酶活性都没有明显的直线相关性。由此可见, 脂肪酶和脱氢酶比较, 菌株脂肪酶活性与蚧虫蜡质的降解率的相关性较高, 说明脂肪酶在降解蚧虫蜡质的过程中发挥的作用更大。

## 3 讨论

昆虫病原真菌感染致死昆虫主要通过体壁入侵, 在此过程中菌丝依靠机械力的作用和分泌各种胞外酶对体壁的降解作用, 其中蛋白酶和几丁质酶是最重要的酶类, 它们可以降解体壁的主要成分蛋白质和几丁质<sup>[14-15]</sup>。但是, 与其他昆虫不同, 日本龟蜡蚧体表具有一层厚蜡壳, 对虫体起保护作用, 蜡壳的主要成分为长碳链的蜡质、烃类、以及糖类和氨基酸形成的内蜜露等组分<sup>[1,6]</sup>, 当病原真菌感染日本龟蜡蚧时必须先降解蜡壳的化学成分, 破坏蜡壳结构, 穿透蜡壳后菌丝才能接触到虫体表皮。因此, 病原真菌必须先分泌对蜡壳化学成分具有降解作用的特殊酶类, 才能攻克蜡壳的障碍。

我们的研究发现, 在含有蚧虫蜡质的无机盐培养液中, 4 个菌株都能够以蚧虫蜡质作为其营养源生长和繁殖, 产生孢子和菌丝, 分泌脂肪酶和脱氢酶。其中蜡蚧霉 V3.4504 和 V3.4505 菌株在培养液中菌丝数量多而孢子数量少, 其脂肪酶和脱氢酶

主要以菌丝分泌。但白僵菌 FDB01 和绿僵菌 TSL06 2 菌株主要以孢子存在, 其中在测定绿僵菌 TSL06 菌株的孢子浓度时未计算其次生分生小孢子的量(图 1-E), 脂肪酶和脱氢酶主要由孢子分泌, 酶的活性随孢子浓度的增加而增加。St. Leger 等(1987)用绿僵菌接种在丽蝇 *Calliphora vomitoria* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 上, 发现酯酶的活性与菌株生长过程中附着胞的形成有直接的关系, 接种 16 h 后随着附着胞的大量出现酶活性逐渐增强<sup>[13]</sup>, 这与本文的结果有相似之处。

从 4 株真菌的脂肪酶活性和脱氢酶活性与对蚧虫蜡质的降解率之间的直线回归方程可以看出, 脂肪酶与蜡质降解率之间的直线相关系数为 0.90, 而脱氢酶的直线相关系数仅 0.18, 说明蜡质被降解的过程中脂肪酶能发挥比脱氢酶更为重要的作用, 因此, 可以考虑将脂肪酶活性作为病原真菌对日本龟蜡蚧致病性的一个毒力因子。Gupta 等(1994)以大蜡螟 (*Galleriamel lonella*) 和粉纹夜蛾 (*Trichopiusia ni*) 的表皮为培养基, 测定球孢白僵菌的脂肪酶活性, 发现脂肪酶活性与昆虫致死率相关性较强<sup>[15]</sup>。姚剑等(2005)用球孢白僵菌在侵染马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus*) 过程中, 也发现脂肪酶活性与昆虫致死率的相关性<sup>[16]</sup>。这些结果说明脂肪酶确实在病原菌入侵寄主昆虫中具有重要作用。同时, 我们还发现对于同一种昆虫蜡质, 菌株之间会表现出明显的差异, 蜡蚧霉 V3.4504 对日本龟蜡蚧蜡质的降解率为 18.2%, 最大脂肪酶活性为 0.128 U/mL, 均大于菌株 V3.4505 的降解率 11.0% 和最大脂肪酶活性 0.056 U/mL。说明菌株 V3.4504 对日本龟蜡蚧会有更高的毒力。这一现象在我们实验室研究这两个菌株侵染沙里院褐球蚧过程中也曾发现, V3.4504 的蛋白酶和几丁质酶的活性均大于菌株 V3.4505, 由此, V3.4504 对该蚧虫致死率也较高, 说明它对蚧虫的毒力比菌株 V3.4505 的强<sup>[4]</sup>。

前人研究发现, 棉铃虫幼虫体表大量的氨基酸和葡糖胺能作为球孢白僵菌分生孢子萌发和菌丝生长所需的碳源和氮源<sup>[17]</sup>, 本研究中发现 4 菌株可以

在以蚧虫蜡质作为唯一营养源的液体培养液中生长发育,这说明病原真菌可能利用日本龟蜡蚧蜡壳中的“内蜜露”作为其碳源和氮源,因为日本龟蜡蚧蜡壳中的“内蜜露”含有葡萄糖、核糖醇、以及氨基酸等成分<sup>[5,18]</sup>。同样,在沙里院褐球蚧的蜜露中也测出可溶性糖的含量占69%,氨基酸包括17种,在低浓度情况下对蚧虫病原菌V3.4504和V3.4505分泌蛋白酶和几丁质酶有促进作用<sup>[19]</sup>。

陈贵元等(2010)发现产脂肪酶的低温细菌 *Yersinia enterocolitica* KM1 菌株产生的脂肪酶对石油烃中 C<sub>4</sub> - C<sub>12</sub> 的酯类化合物具有较好的催化作用<sup>[20]</sup>。本研究中日本龟蜡蚧雌成虫蜡分泌物中长链脂肪酸主要是 C<sub>15</sub>、C<sub>16</sub>、C<sub>18</sub> 等化合物<sup>[6]</sup>。病原真菌可能通过脂肪酶水解蜡质的长链脂肪酸和酯类的酯键,通过脱氢酶活化蜡质中烃类的氢原子,并传递给特定的受氢体,实现烃类的氧化和转化,达到利用蜡质中长碳链的酯类和烃类作为营养碳源,同时起到对蜡质的降解和破坏作用。在摇床培养后发现,蜡质表面出现许多小孔,蜡质发脆,容易断裂,这可能就是蜡质降解导致结构发生的变化。这也可能是病原真菌能入侵蚧虫蜡壳的重要原因。

本研究初步提供了4株病原真菌对蚧虫蜡质的降解与两种酶之间的相关性,但是微生物在降解长链烃类、酯类、醇类、酸类等化合物过程中并不是单一酶的作用,而是多种酶共同作用,在催化烃类时,其末端甲基会生成伯醇,进一步氧化生成脂肪酸,最终被氧化为二氧化碳和氧气<sup>[21]</sup>。那么,病原真菌的脂肪酶是如何与其他酶共同作用,打断蚧虫蜡质中的长碳链,还需要进一步的研究。

## 参考文献

- [1] Tamaki Y. Chemistry of the test cover. // Ben-Dov Y, Hodgson CJ eds. *Soft Scale insect, Their Biology, Natural Enemies and control*. New York: Amsterdam Lausanne: Elsevier. 1997: 55-72.
- [2] Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL. A multigenephylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44:1204-1223.
- [3] Liu WM, Xie YP, Xue JL, Gao Y, Zhang YF, Zhang XM, Tan JS. Histopathological changes of *Ceroplastes japonicus* infected by *Lecanicillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 2009, 101: 96-105.
- [4] Peng GL, Xue JL, Liu WM, Xie YP. Role of protease and chitinase of *verticillium lecanii* in infecting scale insect cuticle. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2010, 15 (2): 220-225. (in Chinese)  
彭国良, 薛皎亮, 刘卫敏, 谢映平. 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. *应用与环境生物学报*. 2010, 15 (2): 220-225.
- [5] Xie YP, Xue JL, Zhang YF, Zheng LY. A review on waxy secretions of scale insects and their chemical composition. *Entomologic Knowledge*, 2004, 41 (6): 512-518. (in Chinese)  
谢映平, 薛皎亮, 张艳峰, 郑乐怡. 蚧虫蜡分泌物的化学研究进展. *昆虫知识*. 2004, 41 (6): 512-518.
- [6] Xie YP, Xue JL. Ultra-morphology and chemical composition of waxes secreted by two wax scale insects, *Ceroplastes ceriferus* (Fabricius) and *C. japonicus* Green (Homoptera: Coccidae). *Acta Entomologic Sinica*, 2005, 48 (6): 837-848. (in Chinese)  
谢映平, 薛皎亮. 角蜡蚧和日本龟蜡蚧蜡分泌物超微结构及化学成分分析. *昆虫学报*, 2005, 48 (6): 837-848.
- [7] Marin JA, Hernandez T, Garcia C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environmental Research*, 2005, 98: 185-195.
- [8] Namkoong W, Hwang EY, Park JS, Choi JY. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, 2002, 119: 23-31.
- [9] Kashmiri MA, Adnan A, Butt BW. Production purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 5 (10): 878-882.
- [10] Silva WOB, Mitidieri S, Schrank A, Vainstein MH. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 321-326.

- [11] Yang L, Li C, Lu JJ, Wang KY. Preliminary study on degradation and isolation of bacteria for degradation of petroleum hydrocarbon. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2007, 25 (4): 484-487. (in Chinese)  
 杨乐, 李春, 鲁建江, 王开勇. 石油降解菌的筛选及其降解能力的初步研究. 石河子大学学报(自然科学版), 2007, 25 (4): 484-487.
- [12] Long YH, Li CR, Hu DJ, Li DA, Fan MZ. Effects under Different Liquid Culture Conditions on Morphology and Exo-polysaccharide of *Acremonium implicatum*. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2004, 31 (3): 269-272. (in Chinese)  
 龙雁华, 李春如, 胡德军, 黎德安, 樊美珍. 不同营养液液体培养对交织顶孢霉形态和胞外多糖的影响. 安徽农业大学学报, 2004, 31 (3): 269-272.
- [13] 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*. *Journal of General Microbiology*, 1987, 133: 1371-1382.
- [14] Lacey L. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, 1997: 153-279.
- [15] Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. Relationship among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Richoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, 64: 13-171.
- [16] Yao J, Huang DQ. The correlation between fatty acid composition, esterase and lipase production and virulence of *beauveria bassiana* against *dendrolimus punctatus*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2005, 21 (3): 167-171. (in Chinese)  
 姚剑, 黄大庆. 球孢白僵菌脂肪酸、酯酶、脂肪酶及其与毒力的关系. 中国生物防治, 2005, 21 (3): 167-171.
- [17] Zhai JB, Huang XL. Studies on behaviour of germination of conidia from *Beauveria bassiana* on the cuticle of *Heliothis zea*. *Acta Microbiologic Sinica*, 1997, 37 (2): 154-158. (in Chinese)  
 翟锦彬, 黄秀梨. 球孢白僵菌在棉铃虫表皮上萌发的研究. 微生物学报, 1997, 37 (2): 154-158.
- [18] 谢映平. 山西林果蚧虫. 中国林业出版社. 1998: 22-38.
- [19] Xue JL, Peng GL, Xie YP, Zhang YF, Han ZZ. Effect of Honeydew Excreted by *Rhodococcus sariuoni* on Infection Ability of *Verticillium lecanii*. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2010, 16 (4): 504-508. (in Chinese)  
 薛皎亮, 彭国良, 谢映平, 张艳峰, 韩珍珍. 沙里院褐球蚧蜜露对病原真菌蜡蚧轮枝菌侵染力的影响. 应用与环境生物学报, 2010, 16 (4): 504-508.
- [20] Chen GY, Ji XL, Lin LB, Wei YL. Isolation and identification of a cold-adapted lipase producing bacterium, study on fermentation conditions and lipase properties. *Journal of Yunnan University Natural Science*, 2010, 32 (1): 108-113. (in Chinese)  
 陈贵元, 季秀玲, 林连兵, 魏云林. 低温脂肪酶产生菌筛选与鉴定、产酶条件及酶学性质研究. 云南大学学报(自然科学版), 2010, 32 (1): 108-113.
- [21] Yang LQ, Jiang JH. The mechanism of microbial degradation petroleum hydrocarbons. *Environmental Protection of Oil & Gas Field*, 2011, 21 (2): 24-27. (in Chinese)  
 杨丽芹, 蒋继辉. 微生物对石油烃类的降解机理. 油气田环境保护, 2011, 21 (2): 24-27.

# Use of entomopathogenic fungi to degrade wax secreted by *Ceroplastes japonicus*

Zhijuan Zhang, Yingping Xie<sup>\*</sup>, Jiaoliang Xue, Jinhua Fan

College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** [Objective] We used entomopathogenic fungi to degrade insect wax. [Methods] We used four fungal strains, *Lecanicillium lecanii* V3.4504, V3.4505, *Beauveria bassiana* FDB01, and *Metarhizium anisopliae* TSL06. Wax coverings of female adults of *Ceroplastes japonicus* Green (Insecta: Hemiptera: Coccoidea) were used as the sole carbon source in the mineral medium. [Results] All of the 4 strains could grow, reproduce, produce enzymes, and degrade wax. During a 7-day culture, the highest lipase activities of the 4 strains, V3.4504, V3.4505, FDB01, and TSL06 were  $0.128 \pm 0.017$ ,  $0.056 \pm 0.002$ ,  $0.124 \pm 0.011$ , and  $0.149 \pm 0.005$  U/mL, respectively. The dehydrogenases activities of the 4 strains were  $0.075 \pm 0.003$ ,  $0.074 \pm 0.003$ ,  $0.061 \pm 0.04$ , and  $0.066 \pm 0.002$  U/mL respectively. The degradation rates of wax by the 4 strains were  $18.20 \pm 0.019$ ,  $11.00 \pm 0.011$ ,  $15.4 \pm 0.017$ , and  $23.10 \pm 0.031\%$ , respectively. [Conclusion] The 4 strains could depredate wax of *C. japonicus*.

**Keywords:** *Ceroplastes japonicus* Green, entomogenous fungi, wax substances, degradation, lipases, dehydrogenases

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070584), by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (2010011042-1) and by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20101401110008)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-351-7018092; Fax: +86-351-7018092; E-mail: xieyingping@eyou.com

Received: 26 November 2012/Revised: 9 February 2013

## 《微生物学报》投稿方式

2012年3月修订

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 介绍信:为了保护知识产权,请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板),要求责任作者(即通信作者)亲笔签名,并盖有公章。
- (5) 受理费:150元(2011年3月由原来的100元调为150元)。