

研究报告

Research Reports

绿僵菌胞外蛋白酶 Pr1C 诱导飞蝗中肠免疫功能分析

郭隆隆^{1,2}, 李贝贝^{1,2}, 李霜^{1,2}, 杜桂林³, 农向群^{1,2},
涂雄兵^{1,2}, 王广君^{1,2*}, 张泽华^{1,2}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 农业农村部锡林郭勒草原有害生物科学观测实验站, 锡林浩特 026000; 3. 全国畜牧总站, 北京 100125)

摘要 为明确金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 胞外蛋白酶 Pr1C 在绿僵菌感染飞蝗 *Locusta migratoria* 中肠中的作用, 从绿僵菌 IMI330189 菌株转录组中获得并分析了 Pr1C 基因全长序列, 设计引物对该基因进行了克隆和原核表达。将表达的 Pr1C 蛋白与绿僵菌 IMI330189 混合后饲喂处理, 测定了混合物对飞蝗的毒力, 并通过荧光定量 PCR 检测了飞蝗中肠免疫相关基因的表达情况。结果显示, 该基因属于绿僵菌类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶家族, 全长为 2 126 bp, 蛋白大小为 71 kDa。Pr1C 与绿僵菌 IMI330189 混合后可以显著提高对飞蝗的毒力。荧光定量结果表明, *Defensin*, *Persephone*, *Tube*, *Relish*, *Dredd* 5 个基因在各处理中表达量均呈现升高趋势, 其中 Pr1C 蛋白和绿僵菌混合处理的变化比其他处理组变化快, 于第 2 天达到较高水平; 绿僵菌处理变化较慢, 于第 6 天达到最高水平。本研究表明, 绿僵菌胞外蛋白酶 Pr1C 可显著提高绿僵菌毒力, 促进绿僵菌感染速率, 为进一步研制和应用生物制剂防治飞蝗提供理论依据。

关键词 绿僵菌; 胞外蛋白酶; 飞蝗; 毒力

中图分类号: S 476.12 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019075

Immune analysis of *Locusta migratoria* midgut induced by *Metarhizium anisopliae* extracellular protease Pr1C

GUO Longlong^{1,2}, LI Beibei^{1,2}, LI Shuang^{1,2}, DU Guilin³, NONG Xiangqun^{1,2},
TU Xiongbing^{1,2}, WANG Guangjun^{1,2*}, ZHANG Zehua^{1,2}

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Scientific Observation and Experimental Station

of Pests in Xilin Gol Rangeland, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xilinhot 026000, China;

3. National Animal Husbandry Service, Beijing 100125, China)

Abstract In order to explore the role of *Metarhizium anisopliae* in the midgut infection of *Locusta migratoria*, the full-length sequence of Pr1C gene was obtained from the transcriptome sequences of *M. anisopliae* strain IMI330189 and primers were designed to clone and express the Pr1C gene. The obtained Pr1C protein was mixed with *M. anisopliae* IMI330189 spore and its toxicity to the locust was checked by using bait-feeding method. The expression level of intestinal immune-related genes in locusts was detected by fluorescence quantitative PCR. NCBI Blast results showed that Pr1C gene belonged to the serine protease family of *M. anisopliae* with a full length of 2 126 bp, and its protein size was 71 kDa. The bioassay results showed that the mixture of Pr1C and *M. anisopliae* IMI330189 could significantly increase the virulence to *L. migratoria*. The expression level of five genes *Defensin*,

收稿日期: 2019-02-23 修订日期: 2019-05-05

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200402); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-34-07); 中央级科研院所基本科研业务费专项(Y208YJ16, Y2019CG03, S2019XM20); 牛顿基金国际合作项目(ST/N006712/1)

* 通信作者 E-mail: wangguangjun@caas.cn

Persephone, *Tube*, *Relish* and *Dredd* showed an increasing trend in all treatments, but the treatment with the mixture of Pr1C protein and metarhizium induced a faster change than other treatments and reached to the highest level on the second day. The treatment with *M. anisopliae* induced slow change in the expression of genes, and the highest level was observed on the sixth day. This study indicated that the extracellular protease Pr1C of *M. anisopliae* could significantly increase the virulence of *M. anisopliae* and its infection rate, providing a theoretical basis for the further development and application of biological preparations for controlling *L. migratoria*.

Key words *Metarhizium anisopliae*; extracellular protease; *Locusta migratoria*; virulence

金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 作为一种广泛存在的昆虫病原真菌能够寄生于多种害虫,它主要通过穿透昆虫体表进入寄主体内,消耗营养,产生毒素等方式致死害虫^[1]。Kucera 在昆虫体壁离体诱导培养条件下首次发现了绿僵菌胞外蛋白酶的活性,并指出菌株的蛋白酶活力与其毒力存在关系^[2]。樊美珍等利用该方法,以马尾松毛虫作为试虫,测定了球孢白僵菌胞外蛋白酶的产量与毒力的关系,进一步证实二者之间存在相关性^[3]。St Leger 等研究发现,胞外蛋白酶 Pr1 作为一组碱性同工酶^[4],能够作用于昆虫表皮中的天冬氨酸和谷氨酸的羧基,降解蛋白质^[5],在绿僵菌对昆虫致病力方面发挥着重要的作用^[6]。St Leger 等通过构建超表达 *Pr1A* 基因的菌株,发现其对昆虫的致病力显著高于野生型菌株^[7]; *Pr1A* 和 *Pr1B* 基因缺失的自发突变体菌株毒力明显降低^[8]。证明 Pr1 是绿僵菌中重要的毒力因子。

Quesada 等研究发现绿僵菌胞外蛋白抽提物经口饲喂后会引引起海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 死亡及中肠结构破坏^[9]。本实验室前期研究也发现,绿僵菌饵剂处理飞蝗,可导致飞蝗中肠微绒毛变形肿胀、断裂脱落逐渐稀疏^[10]。而饲喂含有绿僵菌和胰凝乳蛋白酶抑制剂(TPCK, Pr1 的抑制剂)的飞蝗中肠微绒毛结构完整,未发生脱落变形等现象^[11]。通过测定金龟子绿僵菌 IMI330189 的转录组发现在该菌株中存在包括 *Pr1C* 在内的多个 *Pr1* 基因。为明确 *Pr1C* 基因的功能,本研究以金龟子绿僵菌 IMI330189 为试验材料,从中分离、克隆了胞外蛋白酶 *Pr1C* 基因,测定了 *Pr1C* 对绿僵菌的增效作用及其对蝗虫免疫相关基因表达的影响,为进一步明确其在绿僵菌破坏寄主中肠中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

金龟子绿僵菌 IMI330189 保存于中国农业科学

院植物保护研究所。在 28℃ 条件下,用 PDAY 培养基培养 15 d,刮下分生孢子干燥后于 4℃ 保存。使用前测定孢子含量及萌发率^[12],计算活孢子含量。

1.2 供试虫源

试验所用飞蝗 *Locusta migratoria* 种群为本实验室饲养纯化种群。飞蝗卵在人工气候培养箱中孵化,孵化条件为:温度(30±2)℃,湿度 60%,L//D=16 h//8 h。将同一时间孵化、大小一致的蝗蛹转移到养虫笼(60 cm×50 cm×60 cm)中用新鲜麦苗饲养。饲养条件:L//D=16 h//8 h,温度(30±2)℃,相对湿度 60%。

1.3 培养基

LB 液体培养基:酵母粉 5 g,胰蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,补水定容至 1 000 mL,121℃ 高压灭菌 15 min。

PDAY 固体培养基:马铃薯(去皮煮汁)200 g,琼脂 20 g,蔗糖 20 g,酵母粉 5 g,补水定容至 1 000 mL,121℃ 高压灭菌 25 min。

萌发培养基:蔗糖 2 g,琼脂粉 1.8 g,补水定容至 100 mL,121℃ 高压灭菌 15 min。

菌丝生长培养基:硫酸镁 2 g,酵母粉 10 g,蔗糖 20 g,磷酸氢二钾 5 g,补水定容至 1 000 mL,121℃ 高压灭菌 15 min。

1.4 主要试剂及仪器

试剂主要包括 TransZol Up Plus RNA Kit(全式金),PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa), DL2000 DNA marker (TaKaRa), RNA spin column(全式金),ProteinIso® His-Tag Resin(全式金),TransI-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell(全式金),无核酸酶水(Ambion),胶回收试剂盒(Axygen),质粒提取试剂盒(Axygen),Ex Taq DNA 聚合酶(TaKaRa),氯仿、无水乙醇、异丙醇、丙三醇(国产分析纯)等。本文所用引

物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

仪器主要包括智能人工气候箱(宁波赛福),超净工作台(上海博迅),东胜龙 ETC-811PCR 仪,德国 Sigma3K15 冷冻离心机,THZ-D 台式恒温振荡器(华美生化仪器厂),HPX-9052MBE 数显电热培养箱(上海博迅),ABI Fast 7500 荧光定量 PCR 仪等。

1.5 *Pr1C* 基因克隆与表达

利用菌丝生长培养基培养绿僵菌,使用 TransZol Up Plus RNA Kit(全式金)从绿僵菌菌丝中提取样品总 RNA,PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录样品 cDNA。通过上、下游引物 F1: 5'-ATTTAATGTGCAAAGCCGGTG-3' 和 R1: 5'-CAGATGCTCAGGACGAGAAAGT-3' 对 *Pr1C* 基因进行 PCR 扩增。扩增条件为 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 36 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。扩增后的目的产物进行回收,与 pMD-19-T Easy 载体连接。然后,通过热激法将连接产物转入 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 感受态细胞,利用氨苄抗性筛选阳性菌株。阳性克隆经 PCR 检验正确后,由上海生工生物(北京)公司测序。

从测序确认无误的转化子中提取质粒,并以此为模板,通过含有 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切位点的引物 F2: 5'-GGAATTCATATGGACTGCAACGGT-CAC-3' (*Nde* I) 和 R2: 5'-ACGCGTCGACATT-GTGTCCCCTTTCGACTC-3' (*Sal* I) 进行 PCR, 扩增 *Pr1C* 全长基因片段,PCR 扩增条件为: 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 36 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。将 PCR 产物纯化回收后进行双酶切 (*Nde* I/*Sal* I), 酶切、回收后的片段与 pET-21b 载体进行连接,连接产物转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株,利用氨苄抗性筛选阳性克隆。从筛选出的阳性克隆中提取质粒,进行双酶切、PCR 鉴定。将验证正确的单克隆进行诱导表达,检测目的蛋白 *Pr1C* 的表达情况。

挑取含有 pET-21b-*Pr1C* 质粒的大肠杆菌单菌落, 37℃、220 r/min、活化培养 12 h 后,吸取 4 mL 加入含有 200 mL LB 培养基的三角瓶中,相同条件下培养 2 h; 然后加入 IPTG,终浓度为 0.5 mmol/L, 20℃、150 r/min 诱导培养 8 h。7 000 r/min 离心,收集菌体。加入 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0) 缓

冲液悬浮菌体。在 400 W, 工作 5 s, 间隔 5 s 超声破碎菌体细胞 15 min, 获得所需目的蛋白产物。

目的蛋白含量测定采用 Bradford 考马斯亮蓝方法,以牛血清白蛋白为标准蛋白,用酶标仪在 595 nm 处读取 OD 值,计算样品蛋白含量。

1.6 对飞蝗的毒力测定

1.6.1 试验处理

试验共设 3 个处理,分别为: 1) 浓度为 1.8 mg/mL 的 *Pr1C* 蛋白; 2) 孢子含量 2.5×10^8 个/g 的绿僵菌 IMI330189; 3) 浓度为 1.8 mg/mL 的 *Pr1C* 蛋白 + 孢子含量 2.5×10^8 个/g 的金龟子绿僵菌 IMI330189。以大肠杆菌 BL21(DE3)(含有 pET-21b 空载体)诱导表达的菌体作为空白对照。所有处理和对照都设 5 次重复。

1.6.2 饵剂的配制

称取适量麦麸,加入 5% (V/m) 植物油,混匀。根据不同处理每克麦麸中绿僵菌孢子粉和 *Pr1C* 蛋白的含量、绿僵菌孢子粉中孢子含量及萌发率、*Pr1C* 蛋白溶液的浓度,计算不同处理中所需加入绿僵菌孢子粉和 *Pr1C* 蛋白的量,进行称量,分别加入含有植物油的麦麸中,混匀。4℃ 保存备用。

1.6.3 生物测定

将预先饥饿 12 h 的飞蝗 3 龄若虫放入无菌的塑料筐中(长×宽×高=30 cm×12 cm×9 cm),每筐 30 头,用已消毒的玻璃板盖好。将混合好的饵剂按每 30 头(1 筐)4 g 的量盛放在灭菌的培养皿中,然后放入有蝗虫的塑料筐中,每个处理重复 5 次。蝗虫取食 24 h 后,将饵剂取出,换成新鲜麦苗。每天记录蝗虫死亡数和存活数,连续记录 10 d,计算每天死亡率和存活率,并绘制存活率折线图。

1.7 基因荧光定量检测

按照 1.6.1 相同的处理和重复进行设计,对照组及处理组取食饵剂 24 h 换成麦苗后开始第 1 次取样,然后每间隔 1 d 取样,共取 4 次。每个重复中取活虫 1 头,每个处理共取活虫 5 头,切取中肠,0.75% 的生理盐水清洗,中肠样品液氮速冻后放于 -80℃ 冰箱保存。用 TransZol Up Plus RNA Kit (全式金)提取中肠总 RNA 样品,PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录获得 cDNA,设计荧光定量 PCR 引物(表 1),对飞蝗免疫途径相关基因 *Dredd*、*Defensin*、*Persephone*、*Relish*、

Tube 表达量进行检测,内参选用 β actin。反应程序为:95℃ 预变性 2 min;95℃ 15 s,58℃ 15 s,68℃ 30 s,40 个循环。2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析不同处理后飞蝗免疫基因表达量变化。

表 1 本文所用荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>Dredd</i>	CCTCAATGTTACCAACTCCA TGGCATCTGACAGTGAATCT
<i>Defensin</i>	AGAATGCTCCACGCCGAACGC CCGTCGCAGCACTTCTCTAG
<i>Persephone</i>	ATTACAGCAGAAACTCGTC GCCGCAATAAGGCTATGT
<i>Relish</i>	CACATCTACAGCAACGAATC AGAACAGCACACTGAGAGTCC
<i>Tube</i>	GGAAACAACCTCGTGAAACT GCTTGAATAAAGGGATAGGTCC
<i>actin</i>	GTTACAAACTGGGACGACAT AGAAAGCACAGCCTGAATAG

1.8 数据统计与分析

蝗虫存活率计算方法如下:存活率=存活数/总数×100%,存活率统计结果采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析,分析结果采用 GraphPad Prism 6 软件进行图表制作。

2 结果与分析

2.1 绿僵菌胞外蛋白酶 Pr1C 基因序列分析

对胞外蛋白酶 Pr1C 序列分析结果显示,该基因序列全长 2 124 bp,编码含有 707 个氨基酸的蛋白序列,该基因与类枯草杆菌蛋白酶具有很高的同源性,达到 97%,序列中含有肽酶 S8 家族结构域 (Peptidases_S8_5) 酶家族(丝氨酸蛋白酶家族)结构域 (Peptidases_S8),Ⅶ 型分泌型丝氨酸蛋白酶肌球蛋白 (type Ⅶ secretion-associated serine protease mycosin),Fn3 类结构域 (fn3_5),类 PoS1 蛋白酶相关结构域等保守结构域(图 1)。

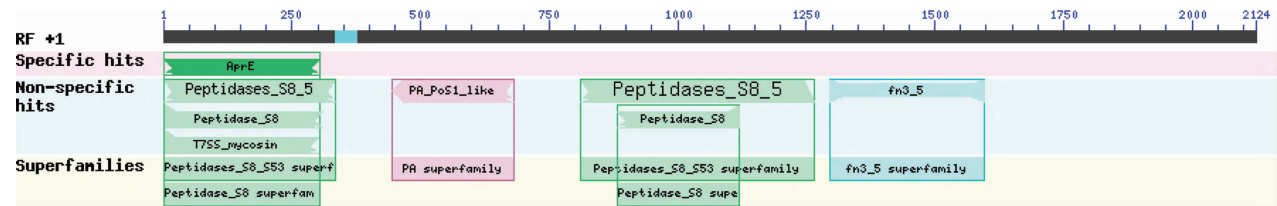


图 1 Pr1C 蛋白结构预测分析

Fig. 1 The prediction and analysis of Pr1C protein structure

2.2 绿僵菌胞外蛋白酶 Pr1C 原核表达载体构建及转化

通过 PCR 从绿僵菌 cDNA 中扩增获得了 2 124 bp 的 Pr1C 基因片段,将其连接到 pMD-19-T Easy 载体,获得了 4 816 bp 的重组质粒 pMD-19-T-Pr1C。以其为模板,采用引物 F2、R2 进行 PCR 扩增,获得了含有 Nde I 和 Sal I 双酶切位点的 Pr1C 基因片段,经 Nde I 和 Sal I 双酶切后插入到 pET-21b 载体相应的酶切位点间,获得 7 567 bp 的重组表达质粒 pET-21b-Pr1C(图 2),然后将质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中。经氨苄抗性筛选,获得了含有重组质粒 pET-21b-Pr1C 的转化子。从转化子中提取质粒进行 PCR 和酶切验证,证明插入的目的片段正确。用 IPTG 对目的基因片段进行诱导表达,结果该转化子可以表达出 71 kDa 的 Pr1C 蛋白(图 2)。

2.3 绿僵菌 IMI330189 与 Pr1C 处理后飞蝗存活率检测

结果显示,随着时间的延长,飞蝗的存活率整体呈现逐渐降低的趋势。在对照中,飞蝗的存活率一

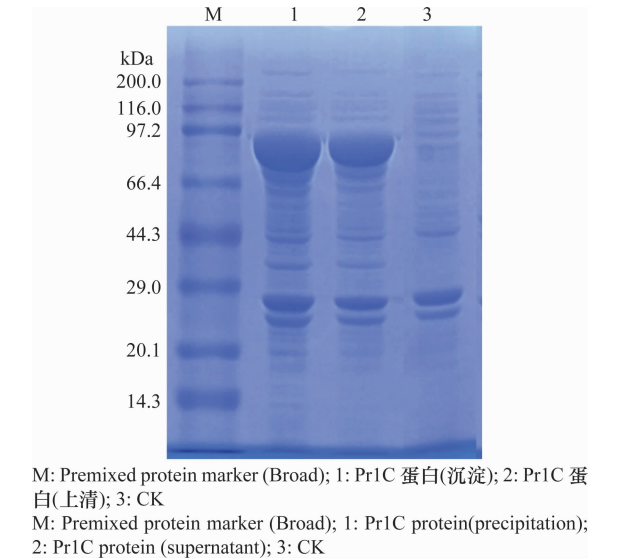


图 2 SDS-PAGE 凝胶电泳检测大肠杆菌中表达的 Pr1C 蛋白
Fig. 2 Detection of Pr1C protein expressed in Escherichia coli by SDS-PAGE

直维持在较高的水平,从第 1 天到第 10 天,存活率只

降低了 10.0%(存活率为 90.7%)。在绿僵菌处理中,由于绿僵菌的侵染导致飞蝗不断死亡,飞蝗的存活率逐渐降低,到第 10 天,降低到 60.7%。Pr1C 处理与绿僵菌处理结果类似,到第 10 天,飞蝗的存活率降低到 63.3%,二者之间没有显著差异($P>0.05$),但与对照组相比,差异显著($P<0.001$)。将绿僵菌与 Pr1C 混合后,飞蝗的存活率迅速下降,到第 10 天降低到只有 30.0%,与其他处理间存在显著差异。

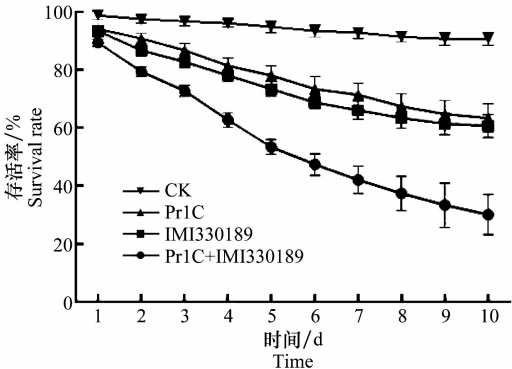


图 3 不同处理下飞蝗存活率

Fig. 3 Survival rates of *Locusta migratoria* under different treatments

2.4 飞蝗中肠免疫途径下游相关基因检测

荧光定量检测结果(图 4)显示,飞蝗取食饵料后,中肠内 5 个免疫相关基因表达量水平总体呈升高趋势。绿僵菌处理中,免疫基因在处理第 2 天呈现出微弱上升,第 4 天表达量增长较多,到第 6 天时表达量达到最高;Pr1C 蛋白处理组中免疫基因在处理第 2~4 天表达量与绿僵菌处理组基本一致,第 4~6 天 5 个基因表达量与第 2~4 天相比呈现出稳定的增长趋势,但显著低于其他处理($P<0.01$);绿僵菌和 Pr1C 蛋白混合处理后,免疫基因在第 2 天即呈现出较高的表达量,第 2~4 天增长最快,第 4 天 5 个基因表达量与其他处理组相比存在极显著差异($P<0.001$),然而到第 6 天时 5 个基因表达量明显低于绿僵菌单独处理,可见绿僵菌和 Pr1C 蛋白混合处理短时间内能够显著增加绿僵菌毒力,促进绿僵菌入侵寄主,并能引起寄主强烈的免疫反应。

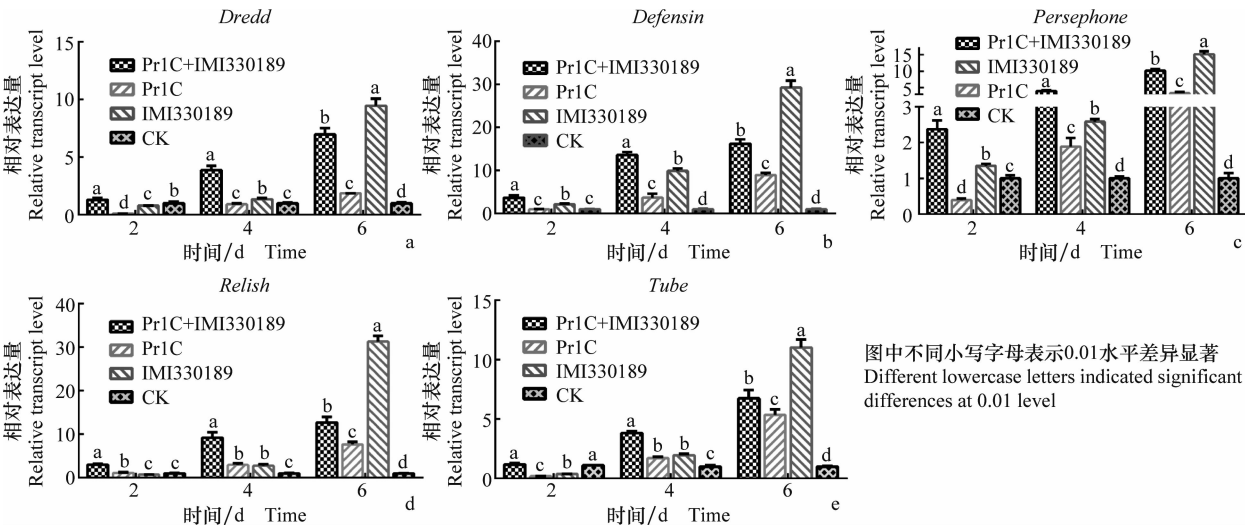


图 4 绿僵菌胞外蛋白酶 Pr1C 处理飞蝗后 5 个免疫途径相关基因在不同时间的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of 5 immune pathway-related genes in *Locusta migratoria* treated with *Metarhizium anisopliae* extracellular protease Pr1C at different time points

3 讨论

昆虫的消化道作为其主要的营养消化和吸收场所,在昆虫的生长发育中起着重要的作用,中肠作为分泌消化酶、消化食物和吸收养分的主要部位^[13],一直以来都受到人们的广泛关注。本文通过体外表达绿僵菌胞外蛋白酶 Pr1C,并采用人工饲料饲喂的

方式对飞蝗进行处理,结果发现绿僵菌胞外蛋白酶 Pr1C 和绿僵菌混合作用的处理中,飞蝗死亡率明显高于单独处理。并且,绿僵菌胞外蛋白酶单独作用的处理中死亡率达到 36.7%。曹伟平等采用饲喂方式处理棉铃虫幼虫的试验发现,球孢白僵菌经消化道侵染后可导致寄主中肠微绒毛脱落严重,肠壁组织溶解,表皮下细胞被菌丝侵染等现象^[14]。王

正浩通过饲喂飞蝗蛋白酶抑制剂的试验发现,食用绿僵菌的飞蝗中肠微绒毛结构遭到破坏,加入 TPCK 后的飞蝗中肠微绒毛结构未发生明显的破坏^[11]。根据这一结果推测飞蝗食用含有绿僵菌胞外蛋白酶 Pr1C 人工饲料后,之所以能够导致飞蝗较高的死亡率,可能的原因是,取食含有胞外蛋白酶的人工饲料后,导致飞蝗中肠微绒毛结构脱落,表皮结构遭到破坏,影响飞蝗正常的取食作用,并影响飞蝗营养吸收,最终使得飞蝗死亡率升高。由此我们也可以得出结论,飞蝗在取食了含有绿僵菌和胞外蛋白酶 Pr1C 的人工饲料后的 2~3 d 内,胞外蛋白酶破坏中肠微绒毛结构,并导致中肠表皮结构破坏,破坏后的中肠表面有利于绿僵菌分生孢子的附着,且分生孢子更容易吸收虫体营养物质,从而促进了绿僵菌的侵染,这使得绿僵菌和胞外蛋白酶混合使用的处理组死亡率明显高于其他处理。

Toll 和免疫缺陷途径 (IMD, immune deficiency pathways) 作为主要的免疫途径,在蝗虫免疫中起重要作用^[15-17]。绿僵菌在侵染过程中释放毒力因子,与寄主 Persephone 蛋白结合,激活 Toll 途径中 SPE 转变为 Spätzle,有活性的 Spätzle 与 Toll 受体胞外域结合从而促进 Toll 途径的激活,使下游髓样分化因子 (myeloid differentiation factor88, MyD88) 参与免疫反应促进 *Tube*、*Pelle* 基因的表达,并最终导致核转录因子 κB ($NF-\kappa B$) 相关的转录调控因子 *Dif* 的磷酸化反应,促进抗菌肽的表达进而抵抗病原菌的入侵^[18]。IMD 途径作为与 Toll 途径协同作用的免疫反应,在病原真菌入侵过程中由寄主防御过程中大量的活性氧簇 (ROS) 的释放而激活该免疫反应,IMD 途径的激活引发下游死亡相关结构域蛋白 (*Fadd*) 和死亡相关的类 *ced-3*/*Nedd2* 细胞凋亡蛋白酶 (*Dredd*) 基因表达,该基因的表达促进核转录因子 κB ($NF-\kappa B$) 和转录因子 *Relish* 基因表达^[19], *Relish* 的大量表达促进抗菌肽的产生抵抗病原菌的入侵^[20-21]。防御素 (defensin) 是一种富含半胱氨酸的肽类物质,拥有抵抗革兰氏阳性菌和参与昆虫抗菌防御反应的作用^[22],在昆虫免疫反应中同样也起到至关重要的作用。在对飞蝗饲喂了含有 Pr1C 和绿僵菌的饵料后,对飞蝗中肠免疫基因的表达量变化进行检测后发现,在 IMD 途径中 *Dredd*、*Relish* 两个基因表达量均上调, Toll 途径中 *Tube*、*Pelle* 两个基因表达量上调,由此可见在绿僵菌入侵中肠

过程中 Toll 途径和 IMD 途径均参与蝗虫中肠的免疫反应,使得下游免疫基因表达量升高,从而促进抗菌肽的产生引发蝗虫中肠免疫反应。

本研究表达了绿僵菌胞外蛋白酶 Pr1C,通过人工饲料饲喂的方式对该蛋白酶作用进行了生物学检测,并对飞蝗存活率和免疫基因进行了转录水平的检测,后期还需要深入研究该蛋白在飞蝗免疫中的作用机制。根据本试验研究结果可以发现,绿僵菌胞外蛋白酶在对绿僵菌侵染飞蝗的过程中发挥着有效的促进作用,因此值得进一步开展作用机理及开发利用研究。

参考文献

- [1] 王海川, 尤民生. 绿僵菌对昆虫的入侵机理[J]. 微生物学通报, 1999, 26(1): 71-73.
- [2] KUČERA M. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1980, 35(3): 304-310.
- [3] 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.
- [4] ST LEGER R J, BIDOCHKA M J, ROBERTS D W. Isoforms of the cuticle-degrading pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae* [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1994, 313(1): 1-7.
- [5] ST LEGER R J, HAJEK A E, STAPLES R C, et al. Fungi for the biocontrol of insects: tools and trends [C]// Molecular Biology of Filamentous Fungi: Embro-workshop, 1992.
- [6] 刘颖, 殷从松. 金龟子绿僵菌致病的分子机理研究进展[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(10): 96-100.
- [7] ST LEGER R, JOSHI L, BIDOCHKA M J, et al. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(13): 6349-6354.
- [8] WANG Chengshu, TYPAS M A, BUTT T M. Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 213(2): 251-255.
- [9] QUESADA E M, CARRASCO-DÍAZ J A, SANTIAGO-ÁLVAREZ C. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep. Noctuidae) [J]. Journal of Applied Entomology, 2006, 130(8): 11.
- [10] 王达, 袁芳芳, 黄大庄, 等. 绿僵菌侵染光肩星天牛幼虫过程的透射电镜观察[J]. 林业科学, 2010, 46(5): 113-115.
- [11] 王正浩. 绿僵菌胞外蛋白酶对东亚飞蝗中肠毒力差异分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.

[25] 张巍巍,李元胜. 中国昆虫生态大图鉴[M]. 重庆:重庆大学出版社,2018.

[26] 蒋金炜,乔红波,安世恒. 农田常见昆虫图鉴[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2015.

[27] 翟保平,张孝羲. 迁飞过程中昆虫的行为:对风温场的适应与选择[J]. 生态学报,1993,13(4):356 - 363.

[28] 高月波,陈晓,陈钟荣,等. 稻纵卷叶螟(*Cnaphalocrocis medinalis*)迁飞的多普勒昆虫雷达观测及动态[J]. 生态学报,2008,28(11):5238 - 5247.

[29] FENG Hongqiang, WU Kongming, CHENG Dengfa, et al. Spring migration and summer dispersal of *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and other insects observed with radar in northern China [J]. Environmental Entomology, 2004, 33: 1253 - 1265.

[30] FENG Hongqiang, ZHANG Yunhui, WU Kongming, et al. Nocturnal windborne migration of ground beetles, particularly *Pseudophonus griseus* (Coleoptera: Carabidae) in China [J]. Agricultural and Forest Entomology, 2007, 9: 103 - 113.

[31] 高月波,孙雅杰,张强,等. 东北粘虫春季空中虫群的迁飞行

为[J]. 应用昆虫学报,2014,51(4):906 - 913.

[32] REYNOLDS D R, SMITH A D, CHAPMAN J W. A radar study of emigratory flight and layer formation by insects at dawn over southern Britain [J]. Bulletin of Entomological Research, 2008, 98(1): 35 - 52.

[33] HOBBS S E, WOLF W W. An airborne radar technique for studying insect migration[J]. Bulletin of Entomological Research, 1989, 79: 693 - 704.

[34] 王建国. 塔城库鲁斯台芨芨草场的特点及其利用改良建议[J]. 中国畜牧兽医文摘,2013,29(12):192,179.

[35] 赵琦. 旋幽夜蛾寄主选择、生殖及抗寒性的研究[D]. 重庆:西南大学,2011.

[36] 高婧,井立军,井立红. 新疆塔城地区大风年际振荡及环流背景[J]. 干旱区地理,2011,34(2):284 - 291.

[37] 高月波. 空中虫群飞行行为机制研究[D]. 南京:南京农业大学,2011.

[38] 郭宏. 新疆塔城地区天然草原退化原因及治理对策[J]. 草食家畜,2015(3):55 - 57.

(责任编辑:田 喆)

(上接 17 页)

[12] 娄延霞. 绿僵菌经口饲喂侵染东亚飞蝗的组织病理学研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013.

[13] 王晓容. 昆虫中肠生理与病理研究进展[J]. 仲恺农业工程学院学报,2000,13(1):58 - 68.

[14] 曹伟平,王刚,甄伟,等. 球孢白僵菌不同感染方式侵染棉铃虫幼虫的毒性比较及组织病理变化[J]. 昆虫学报,2011,54(4):409 - 415.

[15] BUCHON N, SILVERMAN N, CHERRY S. Immunity in *Drosophila melanogaster* from microbial recognition to whole-organism physiology [J]. Nature Reviews Immunology, 2014, 14(12):796 - 810.

[16] 王英,黄复生. 昆虫天然免疫的研究进展[J]. 免疫学杂志,2008,24(4):473 - 478.

[17] 刘甜,罗开珺. 果蝇 Toll 和 IMD 信号通路中的功能结构域[J]. 环境昆虫学报,2011,33(3):388 - 395.

[18] YANG Lishi, YIN Zixin, LIAO Jixiang, et al. A Toll receptor in

shrimp [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(8):1999 - 2008.

[19] HETRU C, HOFFMANN J A. NF- κ B in the immune response of *Drosophila* [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2009, 1(6):a000232.

[20] LAN Jiangfeng, ZHOU Jing, ZHANG Xiaowen, et al. Characterization of an immune deficiency homolog (IMD) in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 41(4):608 - 617.

[21] LI Fuhua, XIANG Jianhai. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2012, 39(1/2):11 - 26.

[22] COCIANCICH S, GHAZI A, HETRU C, et al. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(26):19239 - 19245.

(责任编辑:田 喆)