

• 农业生物技术 •

玫烟色棒束孢 Pr1 酶活力、Pr1 酶基因表达量与其毒力的相关性

王宏民^{1*}, 李赫^{2*}, 张天浩², 张仙红²

1 山西农业大学 经济管理学院, 山西 太谷 030801

2 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801

王宏民, 李赫, 张天浩, 等. 玫烟色棒束孢 Pr1 酶活力、Pr1 酶基因表达量与其毒力的相关性. 生物工程学报, 2019, 35(1): 114–120.

Wang HM, Li H, Zhang TH, et al. Correlation between Pr1 protease activity, Pr1 gene expression and strain virulence of *Isaria fumosorosea*. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 114–120.

摘要: 丝氨酸弹性凝乳蛋白酶 Pr1 是一类能高效降解昆虫体壁蛋白的重要酶, 其活力与虫生真菌的毒力有很大的关系。探索玫烟色棒束孢不同菌株 Pr1 酶活力、Pr1 蛋白酶基因表达量与毒力的相关性对该菌的应用具有重要的意义。文中采用专一性短肽底物 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 和荧光定量 PCR 分别测定了玫烟色棒束孢不同菌株的 Pr1 酶活和 Pr1 基因的表达式, 并采用坡塔喷雾法测定了供试菌株对桃蚜的毒力。结果表明: 不同供试菌株 Pr1 蛋白酶活力与其毒力的线性回归方程为 $y=3.64x+0.62$, $R^2=0.432$, 两者呈正相关; 供试菌株 Pr1 酶活力、Pr1 基因表达式与毒力的回归方程为 $y=0.236+10.833x_1-0.039x_2$ (x_1 =Pr1 酶活力, x_2 =Pr1 基因表达式), $R^2=0.568$, 说明线性拟合方程能很好地反映原始数据; 序列相关系数 D-W 为 2.444, 在 0.05 水平上相关显著, 表明 Pr1 酶活力、Pr1 基因表达式对毒力有显著影响; VIF=12.705 表明 Pr1 酶活力、Pr1 基因表达式存在中度多重共线性。因此建议将 Pr1 蛋白酶的酶活力和 Pr1 基因表达式作为菌株毒力筛选时的重要指标。

关键词: 玫烟色棒束孢, 菌株毒力, Pr1 蛋白酶活力, 基因表达

Correlation between Pr1 protease activity, Pr1 gene expression and strain virulence of *Isaria fumosorosea*

Hongmin Wang^{1*}, He Li^{2*}, Tianhao Zhang², and Xianhong Zhang²

1 College of Economics and Management, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

2 College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

Abstract: Serine elastic chymotrypsin Pr1 is an enzyme that efficiently degrades insect body wall protein through its

Received: April 9, 2018; **Accepted:** July 2, 2018

Supported by: Key Programs for Science and Technology Development of Shanxi Province (No. 20150311010-6), National Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 201801D121253).

*These authors contributed equally to this study.

Corresponding author: Xianhong Zhang. E-mail: zxh6288@sina.com

山西省科技攻关项目 (No. 20150311010-6), 山西省自然科学基金 (No. 201801D121253) 资助。

网络出版时间: 2018-11-09

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181108.1623.001.html>

connection with the virulence of entomogenous fungi. Therefore, it is important to explore the relationship between the Pr1 protease activity, the Pr1 gene expression and the virulence of different strains of entomogenous fungi. Specific peptide substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA and fluorogenic quantitative PCR were used for detecting Pr1 protease activity and Pr1 gene expression, and the slope spray method was used for evaluating the virulence of the fungi on the *Myzus persicae*. The results indicated that the linear regression equation of the Pr1 protease activity and the virulence of different strains were: $y=3.64x+0.62$, $R^2=0.432$. It was shown that there is a positive correlation between the Pr1 protease activity and virulence of different strains. Moreover, the result of the multiple linear regression analysis between Pr1 protease activity, Pr1 gene expression and the virulence of different strains was: $y=0.236+10.833x_1-0.039x_2$ (x_1 represents Pr1 protease activity while x_2 represents Pr1 gene expression), $R^2=0.568$, which suggested that the raw data could be represented by a linear fitting equation. The serial correlation coefficient was high (D-W was 2.444), indicating that Pr1 protease activity and Pr1 gene expression have great effect on the virulence of the fungi. Additionally, VIF=12.705, which shows that moderate multiple collinear exists between Pr1 protease activity and Pr1 gene expression. Therefore, Pr1 protease activity and Pr1 gene expression could be recommended as important indicators for strain virulence selection.

Keywords: *Isaria fumosorosea*, virulence, Pr1 protease activity, gene expression

虫生真菌在入侵寄主的过程中,通过分泌蛋白酶、几丁质酶和脂酶等多种水解酶来降解昆虫体壁^[1],从而入侵寄主昆虫。其中丝氨酸弹性凝乳蛋白酶 Pr1 是一类能高效降解昆虫体壁蛋白的重要酶^[2]。据报道,球孢白僵菌 Pr1 酶在球孢白僵菌侵入虫体过程中起重要作用,且经过基因改良可过量分泌蛋白酶和几丁质酶的白僵菌菌株其毒力显著增强^[3];绿僵菌中也已发现有 10 种丝氨酸弹性凝乳蛋白酶 (Pr1A-Pr1K),且将 Pr1 基因导入绿僵菌中超量表达获得的重组菌株其侵染力明显提高^[4];玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* 表皮蛋白酶基因敲除型菌株对烟粉虱若虫的致死率显著低于对照^[5]。可见,Pr1 酶是虫生真菌的一个重要的毒力因子。

玫烟色棒束孢是一种地理分布广泛、昆虫寄主多样的虫生真菌。早在 1961 年,有关学者就开始利用感染玫烟色棒束孢的棉铃虫进一步感染黏虫、斜纹夜蛾和铜绿金龟子的幼虫^[6]。用玫烟色棒束孢北京变种显著降低了温室黄瓜上的白粉虱的种群数量^[7]。近年来,有关玫烟色棒束孢致病机理^[8-11]、毒力基因克隆和表达^[12]、致病相关基因的差异表达^[13]等已陆续得到了研究。毒力基因高表达是提高昆虫病原真菌毒力和进一步扩大真菌杀虫剂应用的有效手段^[14]。那么不同毒力的菌

株其 Pr1 蛋白酶基因的表达是否存在差异,这种差异与其毒力的相关性如何,目前还未见报道。本试验采用荧光定量 PCR 技术检测了毒力不同的玫烟色棒束孢菌株 Pr1 酶基因的表达量,旨在探讨玫烟色棒束孢 Pr1 酶活力、Pr1 酶基因表达量与其毒力之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

玫烟色棒束孢 Pf-9606、Pf-7606、Pf-904、Pf-941、Pf-14 菌株保存于山西农业大学昆虫实验室。

1.2 供试昆虫

采集个体大小一致的无翅桃蚜,用新鲜离体的桃树叶片(叶柄用湿棉球包裹)在 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $(75\pm 5)\%$ 、12 L : 12 D 光照条件下进行饲养。

1.3 供试药剂

Pr1 蛋白酶专一性短肽底物 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA,购自 Sigma 公司。

试剂盒 TransZol Up Plus RNA Kit、TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (AH311)、TransStart Tip Green qPCR SuperMix,购自北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司。

考马斯亮蓝染色液：0.1 g/L 考马斯亮蓝 G-250，47 g/L 乙醇，85 g/L 磷酸。

冰醋酸、EDTA 均为分析纯。

1.4 毒力测定

对桃蚜的毒力测定采用坡塔喷雾法。取 PDA 培养基 (马铃薯 200 g, 葡萄糖 200 g, 琼脂 200 g, 蒸馏水 1 L) 上培养 10 d 的供试菌株的分生孢子, 用无菌水配制成 1×10^7 孢子/mL 的孢子悬浮液, 每个培养皿中放入 30 头桃蚜, 用坡塔喷雾器进行喷雾, 每皿喷雾量设置为 1 mL, 沉降时间为 40 s。每处理 3 次重复, 用无菌水作对照。逐日定时观察、记录各个处理的桃蚜死亡情况, 并将死亡蚜虫尸体移出放入消毒的培养皿中, 26 °C 保湿培养。采用 SPSS 软件进行数据处理。

1.5 Pr1 蛋白酶活性测定

粗酶液的制备：将湿重 7.5 g 的菌丝接入 100 mL 基本盐培养基 (NaCl 0.3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/L, K_2HPO_4 0.3 g/L) 中, 于 26 °C、180 r/min 的恒温振荡培养箱中培养 24 h, 除去菌体得到粗酶液。

菌株 Pr1 蛋白酶活性的测定参照 Gille-spie 等专一性短肽底物法^[15]。将 1.4 mL Tris-HCl 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 8.0)、50 μ L 粗酶液和 50 μ L Pr1 底物混匀, 28 °C、180 r/min 摇床振荡 10 min, 冰浴 1 min 后终止反应, 410 nm 测定混合液的吸光率, 用 50 μ L DMSO 代替 Pr1 底物设为空白对照。每个菌株 3 次重复。酶活单位定义: 以 pH 8.0、28 °C 使反应混合物每分钟的 OD_{410} 平均增加 0.01 的酶量为一个酶活单位, 酶活以活力表示, 计算

比酶活 (单位: U/mg)。

数据处理: 运用 SPSS 软件进行一元线性回归分析, 将供试菌株的 Pr1 酶活力与致病力进行相关性分析。

1.6 蛋白质浓度测定

利用考马斯亮蓝法, 以牛血清白蛋白为标准品, 测定蛋白含量。

1.7 Pr1 蛋白酶基因表达量测定

1) 按照 TransZol Up Plus RNA Kit 说明书提取供试菌株的总 RNA; 恒压 300 V, 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳 5 min 检测 RNA; 取 1 μ L RNA 样品, 用紫外分光光度计测定提取的各样品的总 RNA 浓度及 OD_{260}/OD_{280} 值。

2) 使用 TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (AH311) 试剂盒, 反转录玫瑰色棒束孢的 RNA 样品。反应体系包含 1 μ g Total RNA、10 μ L 2 \times TS II Reaction Mix、1 μ L TransScript II RT/RI Enzyme Mix、0.5 μ L Random Primer (0.1 μ g/ μ L)、0.5 μ L Anchored Oligo (dT) 20 Primer (0.5 μ g/ μ L) 和 1 μ L gDNA Remover 及 20 μ L RNase-free Water。先将 RNA 模板、引物与 RNase-free Water 混匀, 65 °C 孵育 5 min 后, 冰浴 2 min, 然后再加入其他反应组分, 50 °C 孵育反转录 15 min; 85 °C 加热 5 min 失活 TransScript II RT/RI 和 gDNA Remover。

3) 荧光定量 PCR 引物设计见表 1: 根据汤强提交的 IfuPr1 的 cDNA 序列 (GenBank 登录号 FJ423001.1)^[12], 用 Primer Premier 5 软件设计 qPCR 引物, 以延长因子 (Elongation factor) 基因作为内参基因。

表 1 引物设计

Table 1 Design of primer

Gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Amplicon length (bp)
IfuPr1	IfuPr1-F	TCGTCAGTGGCGAGATTACC	278
	IfuPr1-R	CCCGTGGGAGTCAAGTATCTAT	
Elongation factor	EF-1	CAATGTGGGCAGTGTGGCA	272
	EF-2	TACCTTCGCTCCTTCCAACG	

4) 荧光定量反应体系和条件:使用 TransStart Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒, 反转录玫烟色棒束孢的 RNA 样品, 反应体系包含 1 μ L Template、0.4 μ L Forward Primer (10 μ mol/L)、0.4 μ L Reverse Primer (10 μ mol/L)、10 μ L 2 \times TransStart Tip Green qPCR SuperMix、0.4 μ L Passive Reference Dye (50 \times , optional)、20 μ L ddH₂O。

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40–45 个循环。

5) 数据处理: 当目的基因与内参基因的扩增效率相近时, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算不同玫烟色棒束孢 Pr1 蛋白酶基因相对于对照组的表达量, 不同菌株间差异显著性用 SPSS 进行单因素的新复极法数据分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。柱状图用软件 Excel 绘制。

目的基因的相对表达水平=目的基因与内参基因的倍数差异 (未知样本) /目的基因与内参基因的倍数差异 (对照样本)。

$$\text{Relative Quantity}=2^{-\Delta\Delta CT}。$$

6) Pr1 酶活力、基因表达量与毒力的关系: 运用 SPSS 软件进行多元线性回归分析, 多重比较运用了共线性分析法。将供试菌株的 Pr1 酶活力、蛋白酶 Pr1 基因表达量与致病力进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 供试菌株对桃蚜的毒力及 Pr1 酶活力

供试菌株对桃蚜的毒力及不同菌株的 Pr1 酶

活力如表 2 所示。由表 2 可知, 不同菌株对桃蚜的毒力及 Pr1 酶活力存在一定的差异。其中菌株 Pf 904 毒力最高, 对桃蚜的致病力达 94.13%, 致死中时最短为 2.29 d, Pr1 酶活力最高为 0.085 7 U/mg; 其次为 Pf 7606 菌株, 其毒力和酶活均显著低于 Pf 904 菌株, 其他供试各菌株毒力的变化趋势与 Pr1 酶活力变化基本一致。

2.2 Pr1 蛋白酶基因表达量

由图 1 可知, 供试玫烟色棒束孢不同菌株 Pr1 酶基因表达量存在一定差异。玫烟色棒束孢 Pf 904 和 7606 的基因表达量较高, 且这两菌株的毒力也最高, 分别为对照的 5.9 倍和 5.8 倍; 而玫烟色棒束孢 14、9606、941 的基因表达量较低, 依次为对照的 5.2、4.8、3.1 倍, 且其毒力也呈逐渐趋势。

2.3 供试菌株的致病力、Pr1 酶活力及表达量的相关性分析

2.3.1 供试菌株 Pr1 酶活力与毒力的相关性

以 Pr1 酶活力为自变量, 毒力为因变量, 采用 SPSS 皮尔逊相关分析法, 分析自变量与因变量的相关性及自变量对因变量的被贡献程度。对供试 5 菌株的 Pr1 酶活力与致病力作散点图, 经线性趋势拟合, 得到不同菌株的 Pr1 酶活力与致病力的线性回归分析方程: $y=3.64x+0.62$, $R^2=0.432$, 相关系数达到了极显著水平 (图 2)。由此可知, Pr1 酶活力与供试菌株的致病力呈正相关, 菌株的 Pr1 蛋白酶活性越高, 致病力越强。

表 2 供试菌株对桃蚜毒力及 Pr1 酶活力

Table 2 Virulence and Pr1 protease activity of tested strains

Isolates	Toxicity regression equation	R^2	Mortality	LT_{50}	Pr1 protease activity (U/mg)
Pf 904	$y=0.218x-0.005$	0.811	94.13 ± 2.16 a	2.29	$0.085\ 7\pm0.000\ 8$ a
Pf 7606	$y=0.207x-0.137$	0.996	88.47 ± 7.53 b	2.45	$0.082\ 2\pm0.001\ 6$ b
Pf 14	$y=0.226x-0.106$	0.933	82.36 ± 3.48 c	2.67	$0.080\ 9\pm0.001\ 9$ c
Pf 9606	$y=0.204x-0.057$	0.974	80.70 ± 1.69 c	2.67	$0.081\ 5\pm0.000\ 6$ c
Pf 941	$y=0.223x-0.156$	0.965	71.25 ± 6.26 d	2.90	$0.070\ 1\pm0.000\ 9$ d

Data in the table are $\bar{x} \pm s$, and followed by different letters in the same row mean significant difference at 0.05 level ($P<0.05$) by Duncan's mulitiple test.

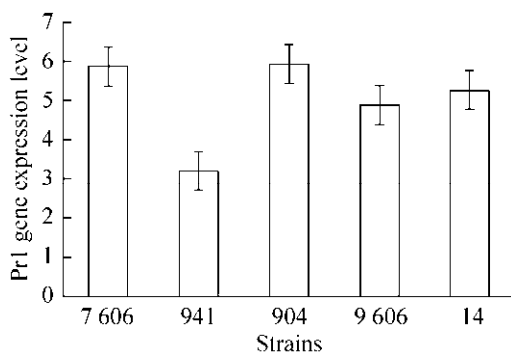


图1 各菌株 Pr1 基因相对表达量

Fig. 1 Pr1 gene relative expression of the strains.

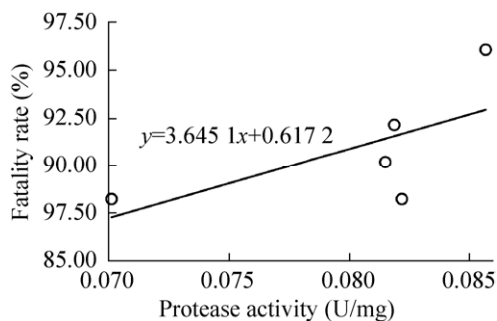


图2 玫烟色棒束孢及球孢白僵菌 Pr1 酶活力与菌株致病力的相关性

Fig. 2 The correlation between Pr1 protease activity and strain lethality of *I. fumosorosea* and *B. bassiana*.

2.3.2 供试菌株 Pr1 酶活力、基因表达量与毒力的关系

以 Pr1 酶活力、Pr1 基因表达量为自变量，毒力为因变量，采用 SPSS 共线性分析，分析了自变量与因变量的相关性与自变量之间的交互作用。结果表明，残差符合正态分布 (图 3)，散落各点符合多元线性回归方程 (图 4)，残差排列散乱毫无规律，说明结果比较理想 (图 5)。

对供试菌株 Pr1 酶活力、Pr1 基因表达量与致病力进行多元线性回归分析，得到方程为 $y = 0.236 + 10.833x_1 - 0.039x_2$ (x_1 =Pr1 酶活力， x_2 =Pr1 基因表达量)：调整 $R^2 = 0.568$ ，说明线性拟合方程能很好地反映原始数据；序列相关系数 D-W 为 2.444，表明方程不存在序列相关，不是伪回归方程； $P(x_1 = 0.367, x_2 = 0.512) < 0.05$ ，表明 Pr1 酶活力、Pr1 基因表达量对致病力有显著影响；VIF=12.705，

证明 Pr1 酶活力、Pr1 基因表达量存在中度多重共线性。由此可知，Pr1 蛋白酶基因表达量与 Pr1 酶活呈正相关，Pr1 蛋白酶活力与菌株的致病力呈正相关，故 Pr1 蛋白酶活力、Pr1 蛋白酶基因表达量均与菌株的致病力存在着一定程度的共线性。

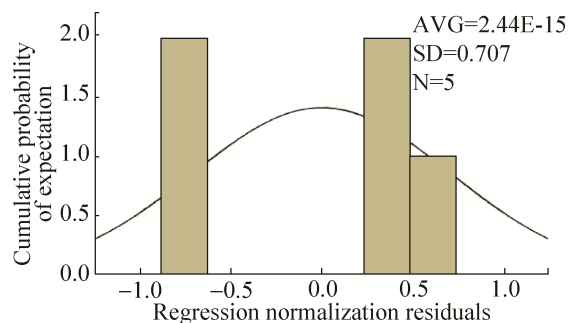


图3 残差直方图

Fig. 3 Histogram of residuals.

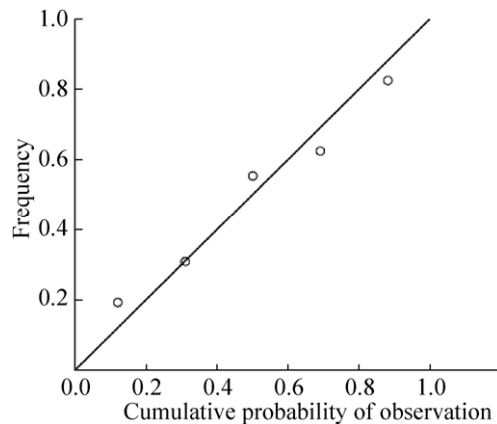


图4 回归标准化残差的标准 P-P 图

Fig. 4 Standardized regression residuals of the standard P-P figure.

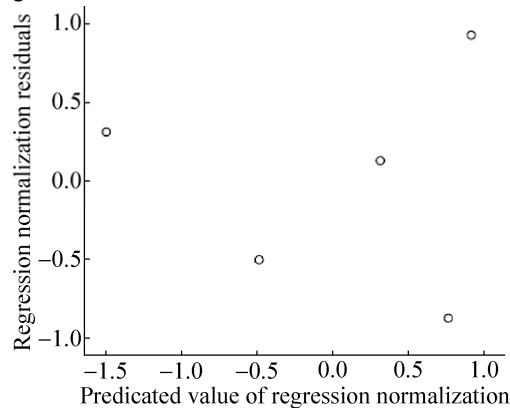


图5 残差散点图

Fig. 5 Residual scatterplot.

3 结论与讨论

多数研究表明,昆虫病原真菌分泌的蛋白酶活力与其毒力之间存在密切联系^[16],如球孢白僵菌菌株的胞外蛋白酶产酶水平高低决定了其对红脂大小蠹致病力的强弱,二者之间呈明显的线性关系^[17];蝉拟青霉胞外蛋白酶活性与对蚜虫的致病力的作用效率具有相关性^[18];白僵菌不同菌株的酶活力与其对害虫的致病力关系为一次函数^[19];球孢白僵菌 GXU-Bb 及其分离菌株 GXU-Bb16、GXU-Bb10、GXU-Bb13 和 GXU-Bb05 两种类型的菌株产酶水平的高低差异与其对小菜蛾的致病力间有显著或极显著相关性^[20]。本试验也表明,供试的玫烟色棒束孢 Pr1 酶活力与其毒力存在线性关系,且相关系数达到了极显著的水平。可见进行玫烟色棒束孢高毒力菌株的初步筛选时,Pr1 酶活力可作为一个重要的参考指标。但由于昆虫病原真菌在侵染昆虫体表时分泌一系列的体壁降解酶,而不同酶对不同体壁成分结构的昆虫发挥的作用可能不完全相同,因此,应进一步深入研究玫烟色棒束孢在侵染不同目昆虫时其蛋白酶活力与其毒力的相关性。

据 St Leger 等报道,将 Pr1 基因导入绿僵菌中超量表达获得的重组菌株其侵染力明显提高;增加绿僵菌 Pr1 基因的拷贝数使其超量表达蛋白酶 Pr1,不仅极大地提高了绿僵菌的毒力,而且使其对寄主昆虫的致死时间缩短了 25%;通过基因工程手段促使绿僵菌超量表达降解表皮的蛋白酶 PR1,可构建高毒力杀虫绿僵菌工程菌株^[4],可见毒力基因高表达是提高昆虫病原真菌毒力和进一步扩大真菌杀虫剂应用的有效手段。本试验通过荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测发现,玫烟色棒束孢不同菌株 Pr1 蛋白酶基因的表达式与 Pr1 酶活呈正相关,且不同菌株 Pr1 基因表达量差异与菌株本身的毒力大小一致,也与本研究生物测定的结果一致。可见,Pr1 基因的表达式和 Pr1

蛋白酶的活力对玫烟色棒束孢菌株的筛选具有重要作用。

本研究采用荧光定量 PCR 方法,以 EF 延伸因子为内参,建立了一种快速准确检测不同菌株 Pr1 蛋白酶基因表达量的方法。该方法方便、高效,并具有良好的重复性,可用于玫烟色棒束不同菌株同一基因表达量的检测,这为高效筛选性状优良菌株提供了有效的技术手段。

REFERENCES

- [1] Charnley AK, Collins SA. Entomopathogenic fungi and their role in pest control//Kubicek C, Druzhinina I, eds. Environmental and Microbial Relationships. Berlin: Springer, 2007: 159–187.
- [2] Charnley AK, St Leger RJ. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects//Cole GT, Hoch HC, eds. The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Boston, MA: Springer, 1991: 267–287.
- [3] Fang WG, Feng J, Fan YH, et al. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. J Inverteb Pathol, 2009, 102(2): 155–159.
- [4] St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, et al. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(13): 6349–6354.
- [5] Gao TN. Infection and influence of reproduction of *Bemisia tabaci* by *Isaria fumosorosea*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016: 1–62 (in Chinese).
高天妮. 玫烟色棒束孢对烟粉虱的侵染及对生殖的影响[D]. 广州: 华南农业大学, 2016: 1–62.
- [6] Pu ZL, Li ZZ. Insect Mycology. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing House, 1996: 1–715 (in Chinese).
蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996: 1–715.
- [7] Fang QX, Yang SF, Hu YM, et al. Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, by *Paecilomyces fumosoroseus* var. *beijingensis* Fang et. Q. T. Chen in greenhouses. Chin J Biol Control,

- 1986, 2(8): 129–131 (in Chinese).
- 方祺霞, 杨淑芳, 胡亚梅, 等. 玫烟色拟青霉北京变种防治温室白粉虱的研究. 生物防治通报, 1986, 2(8): 129–131.
- [8] Lei YY, He YR, Lü LH. Physiological defense responses of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) larvae infected by entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. Acta Entomol Sin, 2011, 54(8): 887–893 (in Chinese).
- 雷妍圆, 何余容, 吕利华. 小菜蛾血淋巴对玫烟色棒束孢入侵的生理防御反应. 昆虫学报, 2011, 54(8): 887–893.
- [9] Lei YY, Lü LH, He YR, et al. The symptoms and histopathological changes of *Plutella xylostella* larvae infected with *Isaria fumosorosea*. Acta Phytophyl Sin, 2011, 38(2): 147–152 (in Chinese).
- 雷妍圆, 吕利华, 何余容, 等. 小菜蛾感染玫烟色棒束孢后的病征及组织病理变化. 植物保护学报, 2011, 38(2): 147–152.
- [10] Wang HM, Zhang H, Hao C, et al. Effects of *Isaria fumosorosea* infection on different enzyme activities in the larvae of *Plutella xylostella*. Mycosystema, 2013, 32(2): 269–276 (in Chinese).
- 王宏民, 张奂, 郝赤, 等. 玫烟色棒束孢侵染对小菜蛾幼虫体内不同酶活的影响. 菌物学报, 2013, 32(2): 269–276.
- [11] Lei YY, He YR, Xie MQ, et al. Transcriptome analysis of immune responses of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) infected by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. Acta Entomol Sin, 2016, 59(9): 956–964 (in Chinese).
- 雷妍圆, 何余容, 谢梅琼, 等. 玫烟色棒束孢诱导的小菜蛾免疫响应表达谱分析. 昆虫学报, 2016, 59(9): 956–964.
- [12] Tang Q. Cloning and expression of the virulence genes from *Isaria fumosorosea* and generation of transgenic *Beauveria bassiana* strains with these genes[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2009: 1–120 (in Chinese).
- 汤强. 玫烟色棒束孢毒力基因的克隆与表达及球孢白僵菌高毒力重组菌株的获得[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009: 1–120.
- [13] Gu JR. Research on the different expression of pathogenicity-related genes of *Isaria fumosorosea*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016: 1–51 (in Chinese).
- 顾家睿. 玫烟色棒束孢致病相关基因的差异表达研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016: 1–51.
- [14] Tang Q, Zhang YP, Xie L, et al. Generation of transgenic *Beauveria bassiana* strains with chitinase gene from *Isaria fumosorosea* and its increased virulence against *Dendrolimus punctatus* (Lepidoptera: Lasiocampidae). Acta Entomol Sin, 2009, 52(7): 755–762 (in Chinese).
- 汤强, 章玉萍, 谢翎, 等. 玫烟色棒束孢几丁质酶的转基因球孢白僵菌菌株的获得及其对马尾松毛虫的毒力增效作用. 昆虫学报, 2009, 52(7): 755–762.
- [15] Gillespie RJ, Bateman R, Charnley AK. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. J Invertebr Pathol, 1998, 71(2): 128–137.
- [16] Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. J General Microbiol, 1987, 133(5): 1371–1382.
- [17] Zhang LW, Liu YJ, Yao J, et al. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates as potential agents for control of *Dendroctonus valens*. Insect Sci, 2011, 18(2): 209–216.
- [18] Li Z, Jin DC, Liu AY. Correlation between extracellular protease of *Paecilomyces cicadae* and its toxicity to *Lipaphis erysimi*. Guizhou Agric Sci, 2010, 38(12): 135–137 (in Chinese).
- 李忠, 金道超, 刘爱英. 蝉拟青霉胞外蛋白酶与菌株毒力的关系. 贵州农业科学, 2010, 38(12): 135–137.
- [19] Tian ZL, Zhu XM, Li QY, et al. Study on correlation between Pr1 protease activity and strain virulence of *Beauveria bassiana*. J Jilin Agric Univ, 2012, 34(6): 607–611 (in Chinese).
- 田志来, 朱晓敏, 李启云, 等. 白僵菌菌株毒力与Pr1蛋白酶活性相关性研究. 吉林农业大学学报, 2012, 34(6): 607–611.
- [20] Lei YY, Lv LH, He YR, et al. Correlation between biological characteristics of *Beauveria bassiana* and its virulence to *Plutella xylostella*. Chin J Biol Cont, 2010, 26(2): 143–148 (in Chinese).
- 雷妍圆, 吕利华, 何余容, 等. 球孢白僵菌生物学特性与其对小菜蛾致病力相关性分析. 中国生物防治, 2010, 26(2): 143–148.

(本文责编 陈宏宇)