

虫生真菌分子致病机理及基因工程改造研究进展

吕丁丁^{1,2} 李增智¹ 王成树^{2*}

(1. 安徽农业大学安徽省微生物防治重点实验室 合肥 230036)
(2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 上海 200032)

摘要: 虫生真菌侵染寄主昆虫的复杂过程可分为体表附着、体壁穿透及体内定殖和致死等不同阶段。近年来,以金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)和球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)为代表的基因功能研究取得了长足的进展,从不同角度阐明了虫生真菌的分子致病机理;同时,基因工程技术的应用为昆虫病原真菌的遗传改良和选育高毒力杀虫菌株开辟了新的途径。对近年来昆虫病原真菌侵染寄主的分子对策及基因工程改造的研究进展进行了综述,并就进一步研究虫生真菌的毒力基因及功能进行了探讨。

关键词: 虫生真菌,致病机理,毒力基因,基因工程

Advances in Molecular Pathogenesis and Genetic Engineering of Entomopathogenic Fungi

LV Ding-Ding^{1,2} LI Zeng-Zhi¹ WANG Cheng-Shu^{2*}

(1. Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)
(2. Institute of Plant Physiology & Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract: The complex of insect mycoses by entomopathogenic fungi includes, in general, spore adhering, cuticle penetration, hemocoel colonization and host death. Recent gene function studies of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* have bettered the understanding of the mechanisms of molecular entomopathogenicity that there are different genes involved in different infection stages. With the identifications of different virulent genes and the exploring of exogenous toxins, genetic engineering works have been reviewed in this paper to demonstrate the potentials to improve the control efficacies of mycoinsecticides by the strategy of toxin gene overexpression. Future studies are discussed to further explore fungal virulent genes and their functions during infection processes.

Keywords: Entomopathogenic fungi, Molecular pathogenesis, Virulent gene, Genetic engineering

随着社会经济的的发展和人们环保意识的提高,环境友好型生物源杀虫剂的应用受到越来越高的重视,但目前包括微生物农药在内的整个生物农药所

占农药市场份额仅约为 10%^[1]。昆虫病原真菌、细菌和病毒用于微生物农药的开发应用均有一定的历史,其中真菌杀虫剂具有安全性好、效费比高、能

够发挥持续控制效果及易于人工培养等优点,是环境友好型生物农药发展的理想选择之一。但另一方面,同细菌、病毒杀虫剂相似,昆虫病原真菌也存在杀虫效果慢、受环境影响较大和效果不稳定等弱点,因而一定程度上限制了真菌杀虫剂的大规模应用。因此,有必要弄清昆虫病原真菌侵染寄主过程中的分子机制,从而有目的地通过基因工程手段对生产菌株进行遗传改良,获得高效工程菌,加速真菌杀虫剂的产业化步伐。本文综述了近年来关于虫生真菌分子致病机理及基因工程改造的研究进展。

1 虫生真菌的侵染过程及相应的分子对策

不同于昆虫病原细菌和病毒,昆虫病原真菌通过昆虫表皮主动入侵进入寄主体内,并最终杀死昆虫,其侵染寄主的复杂过程主要可分为3个阶段:1)体表附着阶段;2)体壁穿透阶段;3)体内定殖及致死阶段。整个过程涉及寄主识别、机械破坏、营养竞争、代谢干扰、毒素分泌及寄主组织结构破坏等,这些多因子作用最终导致寄主死亡^[2]。基因表达序列标签(expressed sequence tag, EST)和微阵列(Microarray)技术研究表明,金龟子绿僵菌在昆虫体壁、昆虫血淋巴和植物根分泌物诱导下,表达基因种类及水平均存在很大程度上的差异,说明不同侵染阶段虫生真菌采用完全不同的基因对策^[3]。在体壁侵染过程中,附着胞的形成和相关水解酶的作用起着非常重要的作用,而细胞壁结构的重新“组装”(re-modification)及杀虫毒素的分泌等决定了虫生真菌能否在寄主体内成功定殖和最终杀死昆虫宿主。

1.1 体表附着阶段

昆虫病原真菌附着体表阶段又可分为两个不同阶段^[4]:1)非特异性附着阶段,主要是疏水孢子与疏水昆虫体壁进行被动附着,附着力较弱;2)特异性的主动附着阶段,通过诱导分泌的孢外蛋白酶类作用,分生孢子牢固地附着在昆虫体壁上。

最初的研究认为疏水蛋白(hydrophobins)主要参与了被动附着阶段。Bowden等^[5]研究表明植物病原真菌新榆枯萎病菌(*Ophiostoma novo-ulmi*)孢子表面的C-U(Cerato-ulmin)疏水蛋白可促进孢子与传播该病原真菌的小蠹虫(bark beetle)进行有效的粘着。在昆虫病原真菌中,St Leger等^[6]首次在金龟子绿

僵菌中克隆到 *ssgA* 疏水蛋白基因,在分生孢子附着阶段,该基因并没有表现出高表达的特征^[7],说明疏水蛋白是在分生孢子形成过程中被分泌到孢子表面的,而不是由于附着及寄主识别作用诱导孢子产生的特异性蛋白。球孢白僵菌气生分生孢子的表面也存在大量的疏水蛋白,而在水生芽生孢子表面却未发现存在疏水蛋白^[4],作者推测具有不同粘附特性的孢子形态的形成可能是由于适应不同的环境条件所造成的。以疏水蛋白等所形成的被动吸附作用在虫生真菌侵染寄主的初始附着阶段起着重要作用^[4]。

疏水蛋白的被动附着力较弱,易受外界因素的影响。研究表明当分生孢子附着到寄主体表后,伴随孢子吸水膨胀的萌发过程,疏水蛋白层被降解,同时形成新的粘附因子^[8]。Wang等^[9]研究发现金龟子绿僵菌孢子表面的粘着蛋白(adhesin)MAD1基因,伴随孢子萌发,该基因表达水平逐渐增强。该基因被缺失后,绿僵菌孢子对寄主体表的附着能力显著下降。另外同假丝酵母(*Candida albicans*)的Int1和Als1及啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的Flo11粘着蛋白一样,MAD1不仅参与了粘附作用,还通过调控 *septin* 等基因的表达水平,影响孢子萌发和菌丝发育等,生物测定表明该基因为毒力基因。绿僵菌同时还具有粘着蛋白MAD2基因,控制孢子与植物表面的附着能力。

1.2 体壁穿透阶段

1.2.1 附着胞(appressorium)的形成:昆虫体壁由外向内可分为上表皮(epicuticle)、前表皮(procuticle)、后表皮(epidermis)和皮脂层(sebum layer)四层结构,主要由蛋白质和几丁质组成,是防止大多数病原微生物入侵的有效物理屏障。同多数植物病原真菌相似,虫生真菌进行昆虫体壁穿透时需要进行附着胞分化,并借助其所形成的机械压力和降解酶的联合作用而穿透昆虫体壁^[10]。附着胞的成功分化与否决定着真菌的毒力,因此研究附着胞形成的分子机理对理解真菌的致病过程是至关重要的。

虫生真菌在进化上同植物病原真菌具有很高的亲缘关系,对于真菌如何识别寄主种类而启动附着胞分化的机理目前尚不清楚。Wang等^[11]发现黄绿绿僵菌(*M. anisopliae* var. *acridum*)的附着胞只在寄主蝗虫(*Schistocerca gregaria*)表面形成,而在非寄主十七年蝉(*Magicicada septendecim*)表面不进行附

着胞分化, 进一步研究表明蝗虫极性提取物可诱导附着胞的产生。因此, 可能像植物病原真菌一样, 虫生真菌附着胞的形成, 需要特定的寄主信号或环境因子的诱导。研究表明, 至少有 Ca^{2+} 和 cAMP 两种第二信使参与的信号传导途径与附着胞的形成有关^[12], 前者至少有两种通道蛋白参与了这一过程^[13]。当附着胞开始形成时, cAMP水平会大幅度地上升, 调节依赖 cAMP 蛋白激酶 (cAMP dependent protein kinase, PKA) 活性, 添加PKA抑制剂会抑制金龟子绿僵菌附着胞的形成^[14]。另外, 稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 疏水蛋白 MPG1 被破坏的菌株附着胞形成的效率和菌株毒力都显著降低^[15], 说明疏水蛋白对真菌附着胞的形成也有较大影响。

人们很早就意识到, 同大多植物病原真菌致病过程相似, 虫生真菌形成附着胞进行体壁穿透时, 除了蛋白水解酶的作用外, 胞内形成高浓度的甘油而产生的渗透压为菌丝穿透提供了重要的机械动力。但直到最近这一个形成机理才得以阐明, Wang等^[16]从绿僵菌中克隆到了脂滴表面特异性表面蛋白基因 *MPL1*, 同哺乳动物的脂被蛋白(perilipin)相似, 此蛋白的N末端包含多个 β -折叠区、3个疏水区域及多个磷酸化位点。脂被蛋白通过疏水区与脂滴锚定结合于脂滴的表面。随着附着胞的形成, 脂滴从分生孢子中被运输到附着胞, 并进一步被降解产生高浓度的甘油而形成高渗透压。另外, 研究也发现 *MPL1* 还参与了附着胞发育过程中细胞间隔(septum)的形成, 分隔的形成增强了附着胞的机械穿透力。

1.2.2 分解寄主外壳的水解酶: 昆虫病原真菌在入侵昆虫体壁的过程中, 会分泌蛋白酶(proteinases)、几丁质酶(chitinase)、脂酶(lipase)等多种胞外水解酶类^[10]。蛋白酶的降解作用不仅利于菌丝穿透侵入, 同时也为菌丝的生长提供营养物质。目前, 对脂酶

的作用了解不多, 蛋白酶的作用研究得较为清楚, 几丁质酶次之。

1) 蛋白质降解酶: 虫生真菌蛋白降解酶在入侵寄主体壁的过程中起重要作用, 其活性高低是决定真菌侵染能力的重要因素^[17]。在以昆虫体壁为唯一碳、氮源的诱导培养基中, 绿僵菌表达分泌多种蛋白酶, 根据其底物活性分为两大类: 一类具有水解 Suc-Ala-Pro-Phe-Nz 多肽活性, 包括 PR1(丝氨酸弹性凝乳蛋白酶, 又称类枯草杆菌蛋白酶 subtilisin); 另一类具有水解 Ben-Phe-Val-Arg-Na 的活性, 包括PR2(丝氨酸类胰蛋白酶)^[18]。金龟子绿僵菌的 *Pr1A*是最先被克隆的降解蛋白基因^[19]。目前为止已有包括PR1A在内的 11 种类枯草蛋白酶基因在绿僵菌中被克隆^[20](图 1)。*Pr1A*类似基因另外还在球孢白僵菌^[21]、布氏白僵菌(*Beauveria brongniartii*)^[22]和粉拟青霉(*Paecilomyces farinosus*)^[23]中被克隆。系统进化研究表明, 虫生真菌类枯草杆菌蛋白酶基因在植物病原真菌中也有分布, 说明为真菌早期进化中的高度保守基因种类^[24,25]。除 PR1A 之外, 其它 PR1 蛋白的功能及其与毒力的关系尚不清楚, 尤其 PR1H 不含信号肽, 为胞内蛋白酶类; 而PR1C同细菌丝氨酸蛋白酶具有更高的同源性, 被认为是真菌通过水平基因转移(horizontal gene transfer)而获得的^[20-24]。

2) 几丁质酶: 几丁质约占昆虫体壁干重的 17%~50%, 可以稳定上表皮蛋白并为昆虫提供机械屏障^[26]。几丁质酶是昆虫病原真菌侵染过程中产生的重要水解酶类。几丁质酶是一种诱导酶, 在以昆虫体壁为唯一 C/N 源的培养基中和穿透寄主体壁时都能表达^[27]。用Dimilin(一种几丁质合成抑制剂)处理烟草夜蛾(*Heliothis assulta*), 几丁质合成受阻的幼虫体壁很容易被金龟子绿僵菌降解^[10], 可见

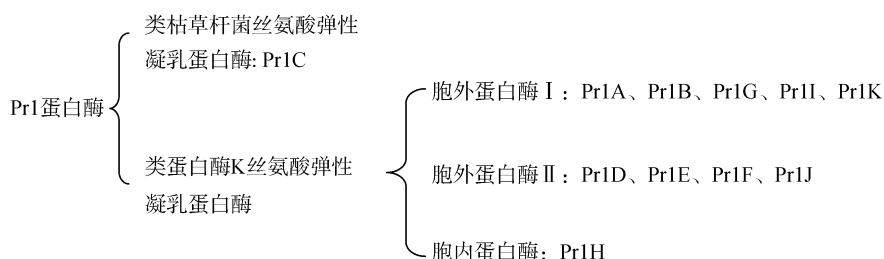


图 1 金龟子绿僵菌 Pr1 蛋白酶种类

Fig. 1 Subtilisin proteases produced by *Metarhizium anisopliae*

几丁质是抵御外来微生物入侵的主要屏障之一。Askary 等^[28]在利用蜡蚧轮枝菌(*Verticillium Lecanii*)感染蚜虫时发现,菌丝周围的几丁质含量较低,显示在该过程中有几丁质酶的产生。昆虫病原真菌能产生多种几丁质酶,分为外切几丁质酶和内切几丁质酶^[29]。从金龟子绿僵菌中克隆到 5 个几丁质酶基因,分别为 *CHIT42*^[30]、*CH11*^[31]、*CHI2*(AJ293217)、*CHI3*(AJ293218) 和 *CH1A*^[32]。从黄绿绿僵菌(*Metarhizium flavoviride*)中克隆到 *CH1*(AJ243014)。从球孢白僵菌中克隆到 2 个几丁质酶基因 *Bbchit1*^[33]和 *Bbchit2*(AY147011)。

几丁质酶与昆虫病原真菌毒力的关系还未取得统一的认识,虽然有间接证据证明几丁质酶在昆虫病原真菌穿透寄主体壁的过程中起一定作用,但是,高效表达几丁质酶基因 *CHIT* 却未能提高金龟子绿僵菌对烟草天蛾(*Manduca sexta*)的毒力^[34]。然而,在白僵菌中高表达几丁质酶(*Bbchit1*),显著提高了白僵菌的杀虫毒力^[33]。产生不同结果的原因可能在于:1)不同研究者使用的菌株和几丁质酶基因均不一样,导致了结果上的差异;2)真菌复杂侵染过程需要不同几丁质酶的共同参与。

1.3 体内定殖阶段

当穿透昆虫体壁进入血腔之后,昆虫病原真菌首先要战胜寄主的免疫保护反应,并进而能够有效地获取寄主体内的营养物质进行生长繁殖。

1.3.1 免疫抵抗反应:虫生真菌侵染至昆虫血腔后,面临着宿主的细胞免疫(cellular immunity)及体液免疫(humoral immunity)作用,即血细胞的包裹(encapsulation)、吞噬作用(phagocytosis)及抗菌肽(antimicrobial peptides)的杀菌防御反应,虫生真菌要实现成功的侵染定殖必须战胜宿主的一系列免疫保护反应。最新的研究表明,昆虫病原真菌的细胞壁成份 β -1,3 葡聚糖(β -1,3 glucan)及其分泌的蛋白酶(PR1)可被寄主细胞双重识别,从而启动细胞免疫及体液免疫^[35]。

昆虫细胞免疫包括单细胞的吞噬作用和多细胞的包裹作用^[36]。为逃避寄主的细胞免疫,虫生真菌在寄主血腔内主要以短棒状的虫菌体(hyphal body)或芽生孢子形式存在,前期的研究认为这类细胞没有或者很少有细胞壁,可最大限度地避免多糖引起的宿主免疫反应^[37]。另外,以出芽式快速繁殖形成的这种单细胞可使得虫生真菌能够快速地在寄主体

内扩散而占领血腔,以“数量”对策逃避宿主细胞的免疫作用。最新的研究发现当金龟子绿僵菌侵染至宿主血腔后,真菌会在其细胞壁表面形成覆盖一种类似宿主胶原质(collagen)的蛋白 MCL1,通过“分子拟态”(molecular mimicry)来逃避血细胞的识别及包裹作用^[38]。MCL1 编码 3 个结构域的高度糖基化蛋白,富含半胱氨酸残基、具有亲水性、带负电荷、中间具有 (GXY)_n重复基序的胶原结构域特征,其中 X 为甘氨酸以外的任一氨基酸, Y 多为脯氨酸; C 末端包含依赖于糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol)的细胞壁锚定位点。富含半胱氨酸残基的 MCL1 蛋白可形成分子内和分子间的二硫键,从而在细胞壁表面形成保护层,包被绿僵菌细胞壁上的 β -1,3-葡聚糖分子,免于昆虫血细胞的包裹或吞噬作用。对于虫生真菌如何克服和抵御宿主昆虫的体液免疫,即抗菌肽和酚氧化酶的杀菌作用机理目前尚不清楚。

1.3.2 分泌毒素:昆虫病原真菌之所以能够克服寄主的免疫杀菌作用,不但与其细胞壁结构重新包装改造有关,而且还同真菌分泌的毒性次生代谢产物(又称毒素)有关。白僵菌和绿僵菌毒素主要有白僵菌素(beauverolides)、环孢素(cyclosporin)和破坏素(destruxins)等,其中有关破坏素的研究较为深入^[36]。破坏素主要通过改变血细胞的 Ca^{2+} 平衡和细胞内高分子蛋白的磷酸化状态来破坏细胞的免疫作用或导致免疫细胞的程序性死亡(program cell death),从而削弱寄主的免疫力^[39]。破坏素还可以激活鳞翅目昆虫肌肉细胞中的 Ca^{2+} 通道,引起昆虫痉挛麻痹,最终导致死亡^[40]。血腔注射真菌毒素不仅可抑制昆虫的免疫系统、影响马氏管的分泌和中肠的正常功能、引起体液免疫中酚氧化酶活性的改变、抑制蜕皮甾类激素的分泌和转运,扰乱昆虫的蜕皮和变态,高浓度的破坏素可直接杀死昆虫^[41]。

1.3.3 体内生长:在感染寄主的过程中,虫生真菌抵抗宿主免疫作用的最终目的是为了进行有效的生长繁殖。如前所述,虫生真菌在昆虫血腔内主要以短棒状的虫菌体或芽生孢子的形式存在。昆虫的血腔中含有大量的碳水化合物、蛋白及脂类。海藻糖(trehalose)是昆虫体内主要的能量贮存物质。在正常情况下,若血淋巴中可利用的葡萄糖浓度降低时, α -葡萄糖酶水平增高而降解海藻糖生成游离葡萄糖;若血淋巴中可利用的葡萄糖浓度较高时,葡萄糖则

被磷酸化, 然后转化成海藻糖^[42]。在金龟子绿僵菌感染的昆虫体内, 这一正常的生理活动被打破。金龟子绿僵菌分泌 α -葡萄糖酶和海藻糖酶降解海藻糖生成游离的葡萄糖, 由于有酸性磷酸酶的存在, 葡萄糖不能转化为海藻糖^[43]。当绿僵菌在烟草天蛾的血淋巴中生长时, 涉及糖、蛋白和脂类代谢的不同基因均有不同程度的表达^[3], 表明绿僵菌可以直接或间接地利用多种营养物质进行生长繁殖。

2 虫生真菌毒力基因工程的研究

对虫生真菌致病的基因对策、真菌-寄主分子相互作用以及寄主免疫反应的分子机理研究有利于为虫生真菌的基因工程改造提供靶点基因和改造策略, 以提高虫生真菌的杀虫效率, 为真菌杀虫剂的大规模应用服务。

虫生真菌基因工程改良首先取决于高效转化体系的建立, 目前广泛采用的转化方法除了经典的PEG/原生质体(PEG/Protoplasts)转化法、限制性内切酶介导的转化法(restriction enzyme-mediated integration、醋酸锂(Lithium acetate)转化法、电击法(Electroporation)和基因枪法(Biolistics)。借助于植物细胞转化的根癌农杆菌介导的遗传转化方法(*Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation, ATMT)在真菌细胞转化中得到了成功应用, 包括在虫生真菌转化中的成功应用^[44,45]。ATMT 以操作简便、转化效率高和易于得到稳定转化子等优点而得到了广泛的应用。

通过基因工程技术提高昆虫病原真菌的毒力是进一步扩大真菌杀虫剂应用的有效手段, 已经报道的毒力基因高表达是一种行之有效的方法。将带有苯菌灵抗性基因质粒 pBENA3 与带有体壁降解酶Prl 基因的质粒 pMAPR-1 于金龟子绿僵菌1080菌株进行原生质体共转化试验, 得到的过量表达 Prl 工程菌株获得了显著提高的杀虫活性^[46]。利用ATMT 转化法得到的超量表达几丁质酶 *Bbchit1* 工程菌获得了对桃蚜(*Myzus persicae*)的高毒力^[33]。Fan等^[47]构建了一个超表达融合几丁质酶(*Bbchit1-BmChBD*)的球孢白僵菌工程菌株, 相对野生菌株对桃蚜的致死时间减少了 23%, 并且毒力也超过 *Bbchit1* 的工程菌株。其原因可能在于: 添加几丁质结合域后提高了几丁质酶与几丁质的结合, 增强了降解昆虫体壁的能力, 加快了转化子穿透体壁的速度,

进而缩短了转化子击倒昆虫的时间。可见, 采用毒力基因的超量表达等基因工程技术可极大地提高虫生真菌的杀虫效率。

3 总结与展望

虫生真菌对宿主的致病、致死是一个十分复杂的过程, 不同侵染阶段均涉及多种基因的参与, 不同基因在不同程度上影响着真菌的发育及致病, 克隆、鉴定昆虫病原真菌的毒力基因并进行功能分析对于理解真菌的致病机理以及进行菌株遗传改良均具有重要的意义。进一步的研究尤其需要阐明虫生真菌如何识别寄主而启动侵染过程以及如何战胜寄主的免疫保护反应, 借助不断更新的研究技术, 开展真菌-昆虫实时分子相互作用研究, 不仅有利于加深理解虫生真菌的致病机理, 同时也可以为动、植物真菌病害的致病机理研究及控制提供理论参考。

迄今国内外已成功通过基因工程技术将内源毒力基因或外源毒素基因导入昆虫病原真菌, 从而获得显著提高毒力的工程菌株, 提高了虫生真菌的杀虫效率。未来的研究还需要通过基因工程改造提高虫生真菌的环境稳定性, 以获得高效、稳定的工程菌株, 从而提高真菌杀虫剂的市场份额, 为绿色农业服务。

参考文献

- [1] Jarvis P. Biopesticides: trends and opportunities. Agrow Reports. London: PJB Publications Ltd, 2001, p.97.
- [2] Clarkson JM, Charnley AK. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol*, 1996, 4: 197-203.
- [3] Wang CS, Hu G, St Leger RJ. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genet Biol*, 2005, 42: 704-718.
- [4] Holder DJ, Keyhani NO. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(9): 5260 ~ 5266.
- [5] Bowden CG, Smalley E, Guries RP, et al. Lack of association between cerato-ulmin production and virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*. *Mol Plant Microbe Interact*, 1996, 9(7): 556-564.
- [6] St Leger RJ, Staples RC, Roberts DW. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 1992, 120(1):

- 119–124.
- [7] Fang W, Bidochka MJ. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycol Res*, 2006, **110**(10): 1165–1171.
 - [8] Wosten HA. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 625–646.
 - [9] Wang C, St Leger RJ. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot Cell*, 2007, **6**(5): 808–816.
 - [10] Charnley AK, St Leger RJ. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. Cole E T, Hoch H C. Fungal Spore Disease Initiation in Plants and Animals. *New York: Plenum Press*, 1991, pp.267–287.
 - [11] Wang C, St Leger RJ. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryot Cell*, 2005, **4**(5): 937–947.
 - [12] St Leger RJ, Butt TM, Staples RC, *et al*. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *J Gen Microbiol*, 1990, **136**: 1779–1789.
 - [13] Magalhães BP, Wayne R, Humber RA, *et al*. Calcium-regulated appressorium formation of the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans*. *Protoplasma*, 1991, **60**: 77–88.
 - [14] St Leger RJ, Laccetti LB, Staples RC, *et al*. Protein kinase in the, lentomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *J Gen Microbiol*, 1990, **136**: 1401–1411.
 - [15] Talbot NJ, Ebbole DJ, Hamer JE. Identification and Characterization of MPG1, a gene Involved in Pathogenicity from the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant cell*, 1993, **5**: 1575–1590.
 - [16] Wang C, St Leger RJ. The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *J Biol Chem*, 2007, **282**(29): 21110–21115.
 - [17] Samuels RI, Paterson IC. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comp Biochem Physiol*, 1995, **110**: 661–669.
 - [18] Segers R, Butt TM, Carder JH, *et al*. The subtilisins of fungal pathogens of insects, nematodes and plants: distribution and variation. *Mycol Res*, 1999, **103**: 395–402.
 - [19] St Leger RJ, Frank DC, Robert DW, *et al*. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur J Biochem*, 1992, **204**: 991–1001.
 - [20] Bagga S, Hu G, Screen SE, *et al*. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 2004, **324**: 159–169.
 - [21] Joshi L, St Leger RJ, Bidochka MJ. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **125**(2-3): 211–217.
 - [22] Sheng J, An K, Deng C, *et al*. Cloning a cuticle-degrading serine protease gene with biologic control function from *Beauveria brongniartii* and its expression in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 2006, **53**(2): 124–128.
 - [23] 黄 勃, 汪章勋, 樊美珍, 等. 粉拟青霉类枯草杆菌蛋白酶基因的 cDNA 克隆及其序列和蛋白质分析. *菌物学报*, 2006, **25**(1): 48–55.
 - [24] Hu G, Leger RJ. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *J Evol Biol*, 2004, **17**(6): 1204–1214.
 - [25] Wang C, Typas MA, Butt TM. Phylogenetic and exon-intron structure analysis of fungal subtilisins: support for a mixed model of intron evolution. *J Mol Evol*, 2005, **60**(2): 238–46.
 - [26] Hillerton JE, Bramley AJ. Summer mastitis. *Vet Rec*, 1984, **115**(12): 307.
 - [27] St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, *et al*. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **162**: 907–912.
 - [28] Askary H, Benhamou N, Brodeur J. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *J Invertebr Pathol*, 1999, **74**: 1–13.
 - [29] 彭仁旺, 管考梅, 黄秀梨. 球孢白僵菌胞内几丁酶的纯化及性质. *微生物学报*, 1995, **35**(6): 427–43.
 - [30] Bogo MR, Rota CA, Pinto H, *et al*. A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol*, 1998, **37**(4): 221–225.
 - [31] Kang SC, Park S, Lee DG. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **165**(2): 267–271.
 - [32] Valadares-Inglis MC, Inglis PW, Peberdy JF. Sequence analysis of the catalytic domain of a *Metarhizium anisopliae* chitinase. *Rev Bras Genet*, 1997, **20**: 161–164.
 - [33] Fang W, Leng B, Xiao Y, *et al*. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Appl Environ. Microbiol*, 2005, **71**: 363–370.
 - [34] Screen SE, Hu G, St Leger RJ. Transformants of *Metarhizium anisopliae* *sf. anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* *sf. acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in

- pathogenicity to *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol*, 2001, **78**(4): 260–266.
- [35] Gottar M, Gobert V, Matskevich AA, *et al*. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*, 2006, **127**(7): 1425–1437.
- [36] Gillespie JP, Bailey AM, Cobb B, *et al*. Fungi as elicitor of insect immune responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2000, **44**: 49–68.
- [37] Pendland JC, Hung SY, Boucias DG. Evasion of host defense by in vivo produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. *J Bacteriol*, 1993, **75**: 5962–5969.
- [38] Wang CS, St Leger RJ. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, **103**: 6647–6652.
- [39] Vilcinskas A, Matha V, GStz P. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmotocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J insect Physiol*, 1997, **43**(12): 1149–1159.
- [40] Bradfisch GA, Harmer SL. omega-Conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Toxicon*, 1990, **28**(11): 1249–1254.
- [41] 宋肖玲, 李国霞. 昆虫病原真菌毒素对昆虫的作用机制研究进展. *微生物学报*, 2002, **42**: 388–392.
- [42] Charnley AK, Cobb B, Clarkson JM. Towards the improvement of fungal insecticides. In: Evans HF, editor. *Microbial insecticides: novelty or necessity? PCB symposium proceedings*, 1997, **68**: 115–126.
- [43] Xia Y, Clarkson JM, Charnley A K. Acid phosphatases of *Metarhizium anisopliae* during infection of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Arch Microbiol*, 2001, **176**(6): 427–434.
- [44] Leclercque A, Wan H, Abschütz A, *et al*. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Curr Genet*, 2004, **45**(2): 111–119.
- [45] Lima IG, Duarte RT, Furlaneto L, *et al*. Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Lett Appl Microbiol*, 2006, **42**(6): 631–636.
- [46] St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, *et al*. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci*. 1996, **93**: 6349–6354.
- [47] Fan Y, Fang W, Xiao Y, *et al*. Directed evolution for increased chitinase activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**(1): 135–139.

新辟栏目介绍

教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2~5 张, 文字 1000 字以内。

2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版(1974~2006)一张。

3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年, 并可将主页网址与我刊友情链接。

4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负, 来稿请加盖公章, 以示负责。

5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。

6、本栏目联系方式:

电话/传真: (010)64117524 联系人: 李 平 胡 丹

E-mail: wswxtb@163.com