

网络出版时间:2019-01-14 09:36

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.07.016

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190114.0935.032.html

钩丝孢属真菌高产蛋白酶菌株的筛选及其 发酵条件优化

刘子卿,万宜乐,全淑芬,单晓云,陈丽丽,郝玉娥

(南华大学 公共卫生学院,湖南 衡阳 421001)

【摘 要】 【目的】筛选钩丝孢属真菌高产蛋白酶菌株,并优化其产酶培养基和发酵条件,为寄生线虫病的生物防治提供优良菌种。【方法】以 15 株钩丝孢属真菌为材料,在 28 ℃、180 r/min 振荡培养 10 d 后,采用福林酚法测定其蛋白酶活性,筛选高产蛋白酶菌株,测定其产酶周期,并利用全齿复活线虫测定该菌株发酵液的杀线虫率。通过单因素试验和正交试验对高产蛋白酶菌株的产酶培养基及发酵条件进行优化,并对优化条件进行验证。【结果】从 15 株钩丝孢属真菌中筛选出 1 株高产蛋白酶菌株 H6,其蛋白酶活性在发酵 5 d 最高。最佳产酶培养基成分为葡萄糖 8 g/L、明胶 8 g/L、蛋白胨 8 g/L、酵母提取物 4 g/L。最佳发酵条件为 pH 7.0、20 ℃、260 r/min、接种 2 块直径 5 mm 的菌块。在此优化条件下,菌株 H6 蛋白酶活性为 216.42 U/mL,比优化前(67.84 U/mL)提高了 2.19 倍。【结论】筛选出 1 株钩丝孢属高产蛋白酶菌株 H6,获得了其优化产酶培养基和发酵条件。

【关键词】 钩丝孢属真菌;蛋白酶;寄生线虫;生物防治

【中图分类号】 S432.45

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)07-0118-07

Screening of a *Harposporium* strain with high infectious protease activity and optimization of its fermentation conditions

LIU Ziqing, WAN Yile, QUAN Shufen, SHAN Xiaoyun, CHEN Lili, HAO Yu'e

(College of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: 【Objective】 This study screened *Harposporium* strains with high protease activity and optimized the enzyme producing medium and fermentation conditions to provide basis for biological control of parasitic nematode. 【Method】 A total of 15 *Harposporium* strains were cultured for 10 days at 28 ℃ and 180 r/min oscillation. The protease activity was determined by Pollin phenol method. The strain with high protease activity was screened and the protease production cycle was confirmed. The nematocidal rate of its fermentation broth was tested by *Panagrellus redivivus*. The enzyme producing medium and fermentation conditions were optimized by single factor test and orthogonal test. At last, the optimized conditions were verified. 【Result】 The strain H6 was screened from the 15 *Harposporium* with the highest protease activity on the 5 th day of fermentation. The optimum medium composition was 8 g/L glucose, 8 g/L gelatin, 8 g/L peptone and 4 g/L yeast extract and the optimum culture conditions were inoculation volume 2 fungus pieces with 5 mm diameter, temperature 20 ℃, pH 7.0 and rotational speed 260 r/min. Under the optimal fermentation conditions, the protease activity was 216.42 U/mL, which was 2.19 times as that (67.84

【收稿日期】 2018-09-28

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31500014);湖南省教育厅科学研究课题(15C1218);衡阳市科技计划课题(2016KS26)

【作者简介】 刘子卿(1991—),女,山东淄博人,在读硕士,主要从事钩丝孢属真菌生物防治研究。E-mail:liuzq_1203@163.com

【通信作者】 郝玉娥(1978—),女,山西平遥人,副教授,博士,主要从事食线虫真菌资源及生防应用研究。

E-mail:haohao200701@126.com

U/mL) before optimization. 【Conclusion】 A strain with high protease activity *Harposporium* named H6 was screened and its enzyme producing medium and fermentation conditions were optimized.

Key words: *Harposporium*; protease; parasitic nematode; biological control

植物寄生线虫给农作物造成巨大损失,导致其产量下降,经济损失严重,全球每年因植物寄生线虫所致的经济损失高达 2 160 亿美元^[1-3]。用于治疗寄生线虫的传统化学农药对生态环境造成的危害不可逆,因此生物防治受到更多的关注^[4]。作为线虫天敌之一的食线虫真菌成为研究开发杀线虫生物制剂的主要来源^[5-6]。钩丝孢属(*Harposporium*)真菌是食线虫真菌中的一类内寄生真菌,能寄生在线虫生长的各个阶段,独特的吞食孢子特征为其发挥杀线虫作用提供了更多可能性^[7-9]。

钩丝孢属真菌侵染植物寄生线虫的步骤是识别、吸引、粘着、侵入和消解,其中最重要的环节是侵入,而蛋白酶在入侵过程中发挥重要作用^[10]。线虫体壁和消化道表面覆盖一层有弹性的非细胞结构天然屏障,即角质膜。蛋白质是构成线虫角质膜的主要成分,因此蛋白酶能有效降解线虫体壁,破坏角质膜的完整性,有利于真菌穿透侵染^[11-12]。但迄今为

止,关于钩丝孢属真菌分泌胞外蛋白酶对植物寄生线虫的作用尚未见报道。

为了解钩丝孢属真菌杀线虫过程中胞外蛋白酶的产生与发酵培养基成分和发酵条件之间的关系,提高其杀线虫率,本研究从前期收集的 15 株钩丝孢属真菌中,筛选产蛋白酶活性最高的菌株,测定其产蛋白酶周期和杀线虫活性,并对其发酵培养基及发酵条件进行优化,确定最佳培养基成分和最佳发酵条件,以期为研究钩丝孢属真菌的杀线虫机制奠定基础,也为植物寄生线虫的生物防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

钩丝孢属(*Harposporium*)真菌和全齿复活线虫(*Panagrellus redivivus*)均由云南大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室提供,具体信息见表 1。

表 1 供试钩丝孢属真菌菌株

Table 1 Strains of *Harposporium* fungi tested in this study

菌株 Strain	菌株名称 Name of strain	菌种编号 Number of strain	菌株 Strain	菌株名称 Name of strain	菌种编号 Number of strain
H1	极小钩丝孢 <i>Harposporium lilliputanum</i>	YMF 1. 01731	H9	线虫钩丝孢 <i>Harposporium anguillulae</i>	YMF 1. 01751
H2	螺旋钩丝孢 <i>Harposporium helicoides</i>	YMF 1. 01733	H10	线虫钩丝孢 <i>Harposporium anguillulae</i>	YMF 1. 02059
H3	尖钩钩丝孢 <i>Harposporium oxycracum</i>	YMF 1. 01735	H11	钩丝孢属 <i>Harposporium</i> sp.	YMF 1. 02101
H4	极小钩丝孢 <i>Harposporium lilliputanum</i>	YMF 1. 01303	H12	螺旋钩丝孢 <i>Harposporium helicoides</i>	YMF 1. 01745
H5	中华钩丝孢 <i>Harposporium sinense</i>	YMF 1. 01743	H13	奇妙钩丝孢 <i>Harposporium thaumasium</i>	YMF 1. 01744
H6	钩丝孢属 <i>Harposporium</i> sp.	YMF 1. 01749	H14	钩丝孢属 <i>Harposporium</i> sp.	YMF 1. 01754
H7	钩丝孢属 <i>Harposporium</i> sp.	YMF 1. 01758	H15	螺旋钩丝孢 <i>Harposporium helicoides</i>	YMF 1. 02058
H8	多孢钩丝孢 <i>Harposporium multisporum</i>	YMF 1. 01757			

1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖培养基:马铃薯削皮后,称取 200 g,切成小块,煮沸 30 min,4 层纱布过滤;葡萄糖 20 g,琼脂粉 17 g,蒸馏水 1 000 mL,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

产酶培养基:葡萄糖 2 g,明胶 2 g,蛋白胨 2 g,酵母提取物 1 g,(NH₄)₂SO₄ 1 g,KH₂PO₄ 2 g,Mg-SO₄ · 7H₂O 0. 5 g,CaCl₂ 0. 1 g,FeSO₄ · 7H₂O 0. 01 g,马铃薯 100 g,(2~3)×10⁵ 条全齿复活线虫,蒸馏水 1 000 mL,pH 6. 5,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

1.3 试验方法

1.3.1 高产蛋白酶菌株筛选 将前期收集的 15 株

钩丝孢属真菌活化后,用直径 5 mm 打孔器沿菌落边缘切下。将活化的供试菌株接种在装有 100 mL 灭菌产酶培养基的 250 mL 锥形瓶中发酵培养,28 ℃、180 r/min 振荡培养 10 d,采用福林酚法^[13-15]测定蛋白酶活性。

1.3.2 H6 产酶周期性测定 将 H6 菌株于 28 ℃、180 r/min 摇床培养,分别在发酵 1,2,3,4,5,6,7,8,9 和 10 d 各取样 1 次,测定蛋白酶活性。

1.3.3 H6 杀线虫率测定 将 H6 于 28 ℃、180 r/min 摇床培养,分别在 1,2,3,4,5,6,7,8,9 和 10 d 各取发酵液 200 μL 作用于 100 条全齿复活线虫,分别在作用 24,36,48 和 60 h 观察全齿复活线虫的死亡情况,计算 H6 杀线虫率,每组 3 个平行样。设未

发酵的培养液为空白对照组。

1.3.4 H6 产酶培养基优化的单因素试验 在初始产酶培养基基础上,分别设置葡萄糖质量浓度为 1,2,4,6,8,10 和 12 g/L;明胶质量浓度为 1,2,4,6,8,10 和 12 g/L;蛋白胨质量浓度为 1,2,4,6,8,10 和 12 g/L;酵母提取物质量浓度为 0.5,1,2,3,4,5 和 6 g/L,在 pH 6.5、28 ℃、180 r/min 条件下,

表 2 高产蛋白酶菌株产酶培养基正交试验的因素及水平

水平 Level	葡萄糖/(g·L ⁻¹) Glucose A	明胶/(g·L ⁻¹) Gelatin B	蛋白胨/(g·L ⁻¹) Peptone C	酵母提取物/(g·L ⁻¹) Yeast extract D
1	4	4	4	2
2	6	6	6	3
3	8	8	8	4

1.3.6 H6 发酵条件优化 在初始发酵条件(28 ℃、180 r/min、接种 1 块直径 5 mm 的菌块)基础上,分别设置 pH 为 5.0,6.0,7.0,8.0 和 9.0;发酵温度为 15,20,25,30,35 和 40 ℃;转速为 100,140,180,220 和 260 r/min;接种量为 1,2,3,4 和 5 块直径 5 mm 的菌块;发酵培养 5 d,测定蛋白酶活性,每组 3 个平行样,对目标菌株的发酵条件进行优化。

1.4 验证试验

分别在初始产酶培养基(葡萄糖 2 g/L、明胶 2 g/L、蛋白胨 2 g/L、酵母提取物 1 g/L)和优化产酶培养基(葡萄糖 8 g/L、明胶 8 g/L、蛋白胨 8 g/L、酵母提取物 4 g/L)中,接种菌株 H6,在对应的初始发酵条件(pH 6.5、28 ℃、180 r/min、接种 1 块直径 5

接种 1 块直径 5 mm 的菌块发酵培养 5 d,测定蛋白酶活性,以优化目标菌株的产酶培养基。

1.3.5 H6 产酶培养基优化的正交试验 选取葡萄糖(A)、明胶(B)、蛋白胨(C)和酵母提取物(D)作为自变量,以 H6 菌株的蛋白酶活性为因变量,设计四因素三水平正交试验,对 H6 菌株的产酶培养基进行优化,具体试验方案见表 2。

mm 的菌块)和优化发酵条件(pH 7.0、20 ℃、260 r/min、接种 2 块直径 5 mm 的菌块)下,发酵培养 5 d,测定蛋白酶活性,验证最佳产酶培养基成分及最佳发酵条件。

1.5 数据处理

试验数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,采用单因素方差进行比较, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 高产蛋白酶菌株的筛选

15 株钩丝孢属真菌在 28 ℃、180 r/min 发酵培养 10 d,其蛋白酶活性测定结果如图 1 所示。

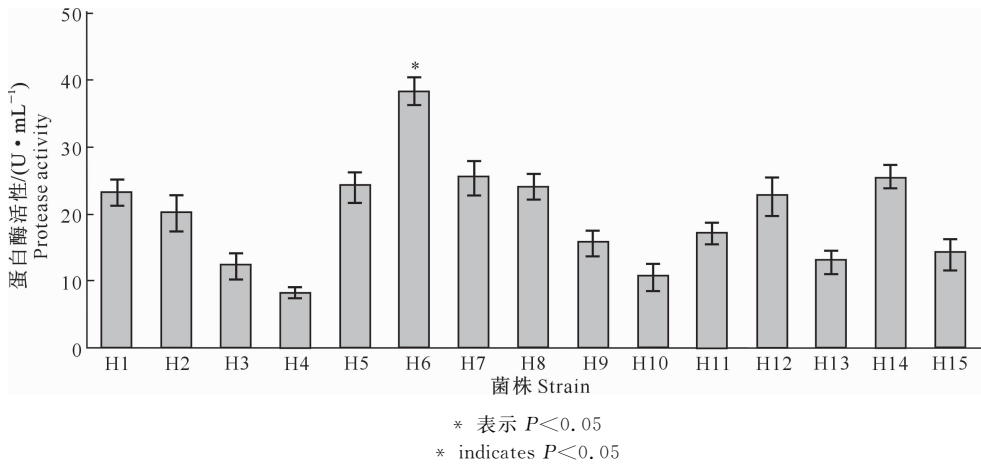


图 1 高产侵染线虫蛋白酶的钩丝孢属真菌筛选

Fig.1 Screening of *Harposporium* strain with high activity of nematode infectious protease

由图 1 可知,钩丝孢属真菌 H6 蛋白酶活性最高,为 38.29 U/mL。经统计学分析发现,菌株 H6 蛋白酶活性显著高于其他菌株($P<0.05$)。因此,选择钩丝孢属真菌 H6 作为高产蛋白酶菌株,并对其发酵条件进行优化。

2.2 菌株 H6 的产蛋白酶周期

由图 2 可知,发酵 1~3 d,菌株 H6 蛋白酶活性增长缓慢;发酵 3~5 d,蛋白酶活性急剧增大,到发酵 5 d 时蛋白酶活性达最高值,为 96.63 U/mL;之后蛋白酶活性随发酵时间延长呈下降趋势,因此后

续优化试验选用 H6 发酵 5 d 的发酵液进行优化。

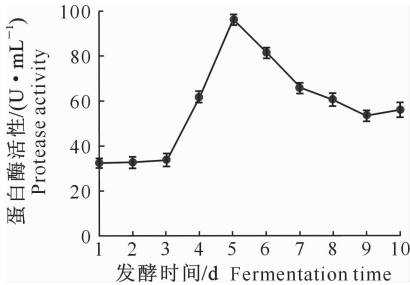


图 2 H6 菌株产蛋白酶周期
Fig 2 Protease production cycle of strain H6

2.3 菌株 H6 发酵液的杀线虫率

由表 3 可知,菌株 H6 1~10 d 的发酵液作用全齿复活线虫 24 h 时,全齿复活线虫死亡率较低。菌株 H6 5~7 d 发酵液作用全齿复活线虫 36 h 时,其杀线虫率均大于 50%,作用 48 h 时其杀线虫率达到 70%以上;菌株 H6 5~10 d 发酵液作用全齿复活线虫 60 h 时,其杀线虫率均大于 90%。说明菌株 H6 5~10 d 的发酵液对全齿复活线虫均有较高的杀线虫活性。

表 3 菌株 H6 发酵液的杀线虫率

Table 3 Fatality rate of fermentation broth of strain H6 to nematodes

发酵时间/d Fermentation time	杀线虫率/% Fatality rate			
	24 h	36 h	48 h	60 h
CK	0	3.0	5.3	7.7
1	0	0	3.7	9.3
2	0	1.0	6.7	9.0
3	2.7	4.0	9.7	10.3
4	5.0	27.0	34.7	50.0
5	7.0	54.6	75.7	94.5
6	6.7	52.6	76.0	94.5
7	5.6	53.3	75.3	94.7
8	6.0	34.7	67.5	94.0
9	6.3	32.3	67.3	93.3
10	5.7	29.7	64.5	91.0

2.4 菌株 H6 产酶培养基优化的单因素试验结果

菌株 H6 产酶培养基优化的单因素试验结果见

图 3。

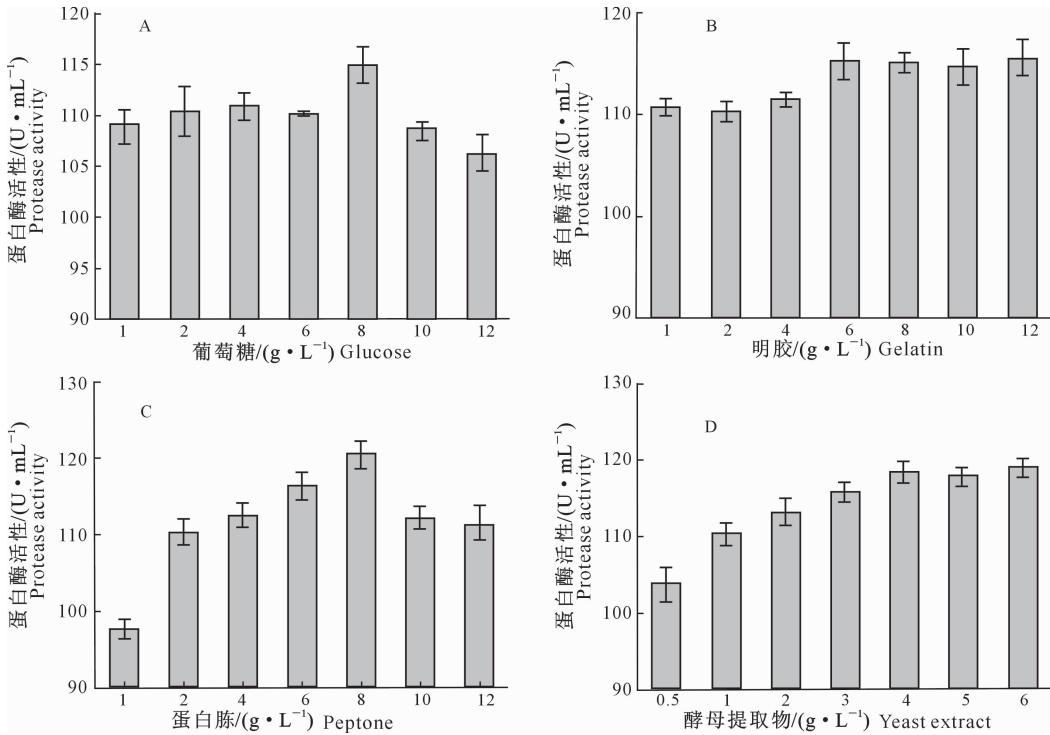


图 3 葡萄糖、明胶、蛋白胨和酵母提取物对菌株 H6 产蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Effect of glucose, gelatin, peptone and yeast extract on protease activity of strain H6

由图 3-A 可知,葡萄糖质量浓度为 1,2,4,6 g/L 时,蛋白酶活性变化不明显;当葡萄糖质量浓度为 8 g/L 时,蛋白酶活性最高,为 114.96 U/mL,是初始培养基的 1.04 倍;当葡萄糖质量浓度大于 8 g/L 时,蛋白酶活性开始下降,表明葡萄糖最佳质量浓度为 8 g/L。

由图 3-B 可知,明胶质量浓度为 1,2,4 g/L 时,蛋白酶活性相当;当明胶质量浓度增加到 6 g/L 时,蛋白酶活性上升,约为 115 U/mL;当明胶质量浓度继续增大时,蛋白酶活性变化不明显,因此确定明胶最佳质量浓度为 6 g/L。

由图 3-C 可知,蛋白胨质量浓度为 1 g/L 时,蛋白酶活性明显低于初始培养基(2 g/L);当蛋白胨质量浓度高于 2 g/L 时,蛋白酶活性随蛋白胨质量浓度增加而增加;当蛋白胨质量浓度增加到 8 g/L 时,

蛋白酶活性最高,为 120.58 U/mL,是初始培养基的 1.09 倍;当蛋白胨质量浓度超过 8 g/L 时,蛋白酶活性逐渐下降,可确定明胶最佳质量浓度为 8 g/L。

由图 3-D 可知,蛋白酶活性随酵母提取物质量浓度增加而增大;当酵母提取物质量浓度增加到 4 g/L 以上时,蛋白酶活性变化不明显,趋于稳定,约为 118 U/mL,是初始培养基的 1.07 倍。由此确定酵母提取物最佳质量浓度为 4 g/L。

2.5 菌株 H6 产酶培养基优化的正交试验

从表 4 可以看出,各因素主次顺序为 D>C>A>B,即酵母提取物>蛋白胨>葡萄糖>明胶,最优组合为 A₃B₃C₃D₃,即葡萄糖、明胶、蛋白胨质量浓度均为 8 g/L,酵母提取物质量浓度为 4 g/L,这与单因素试验结果基本吻合。

表 4 菌株 H6 产酶培养基的正交试验结果

Table 4 Orthogonal test for enzyme producing medium of strain H6

试验号 Experimental number	葡萄糖 Glucose A	明胶 Gelatin B	蛋白胨 Peptone C	酵母提取物 Yeast extract D	蛋白酶活性/(U·mL ⁻¹) Protease activity
1	1	1	1	1	118.18
2	1	2	2	2	155.87
3	1	3	3	3	200.08
4	2	1	2	3	183.17
5	2	2	3	1	167.57
6	2	3	1	2	168.88
7	3	1	3	2	187.73
8	3	2	1	3	174.72
9	3	3	2	1	166.27
K ₁	474.13	489.08	461.78	452.02	
K ₂	519.62	498.16	505.31	512.48	
K ₃	528.72	535.23	555.38	557.97	
R	54.59	46.15	93.60	105.95	

2.6 菌株 H6 发酵培养条件优化

由图 4-A 可知,当 pH<7.0 时,菌株 H6 蛋白酶活性随 pH 增加而升高;当 pH 为 7.0 时,蛋白酶活性最高;当 pH>7.0 时,蛋白酶活性开始逐渐下降。该结果表明 pH 过高或过低均不利于蛋白酶的产生,因此菌株 H6 最佳发酵培养 pH 为 7.0。

由图 4-B 可知,发酵温度在 15~20 ℃ 时,菌株 H6 蛋白酶活性随温度增加而升高;发酵温度在 20 ℃ 时,蛋白酶活性最高;发酵温度超过 20 ℃ 时,蛋白酶活性随温度升高而下降。该结果表明菌株 H6 最佳产酶发酵温度为 20 ℃。

由图 4-C 可知,随着转速的加快,菌株 H6 蛋白酶活性呈上升趋势。转速在 260 r/min 时,菌株 H6 蛋白酶活性达最大值。由此看出,菌株 H6 较佳产酶转速为 260 r/min。

由图 4-D 可知,接种 1~2 块直径 5 mm 的菌块时,菌株 H6 蛋白酶活性明显升高;超过 2 块菌块时,随着接种量增大,蛋白酶活性下降。说明接种量过大或过小均会影响蛋白酶活性,接种量过小会延长培养时间,影响产酶速度;而接种量过大不但不能提高产酶速度,还会引起溶氧不足,导致蛋白酶活性降低。由此看出,菌株 H6 最佳产酶接种量为 2 块直径 5 mm 的菌块。

2.7 菌株 H6 产蛋白酶优化条件验证

将菌株 H6 在初始产酶培养基和发酵条件下培养 5 d,蛋白酶活性为 67.84 U/mL;将菌株 H6 在优化产酶培养基和优化发酵条件下培养 5 d,蛋白酶活性为 216.42 U/mL,比优化前提高了 2.19 倍,表明本试验所得最佳产酶培养基和最佳发酵条件有利于钩丝孢属真菌 H6 分泌蛋白酶。

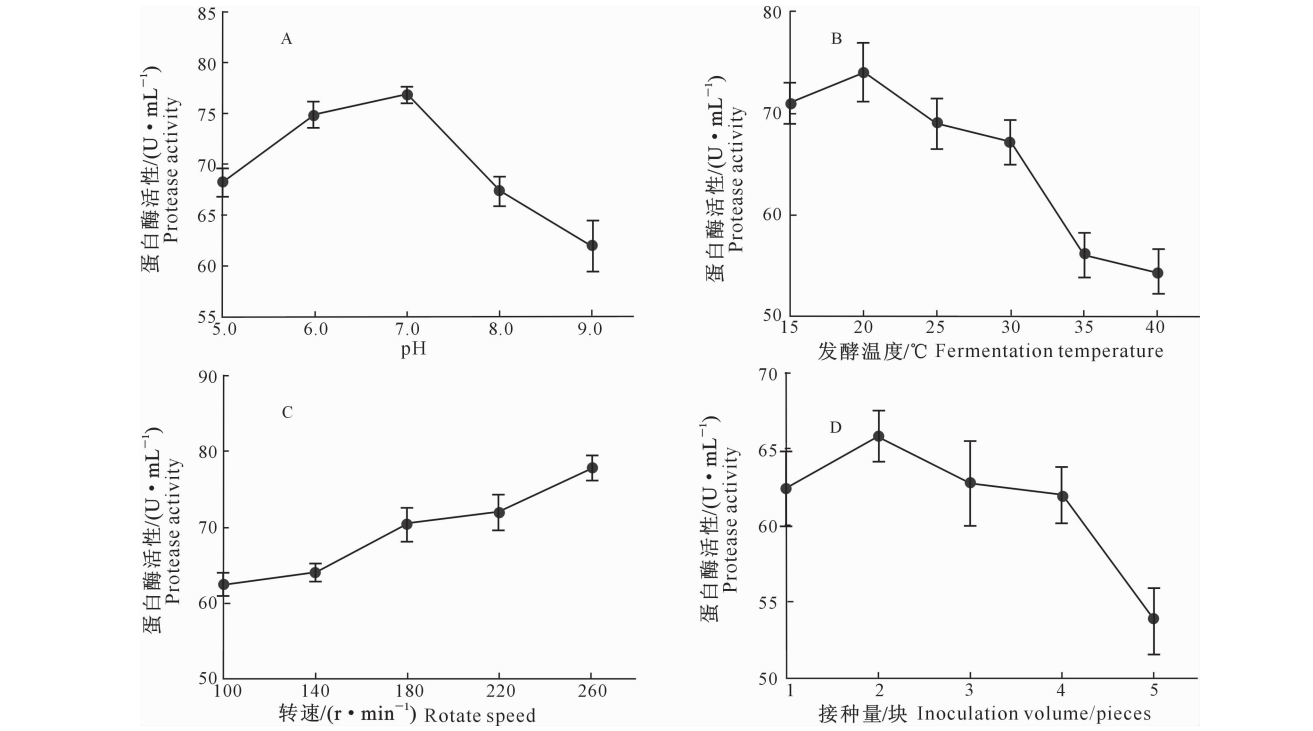


图 4 pH、发酵温度、转速和接种量对菌株 H6 产蛋白酶活性的影响

Fig. 4 Effect of pH,fermentation temperature,rotate speed and inoculation volume on protease activity of strain H6

3 讨论

多种线虫内寄生真菌如线虫钩丝孢(*Harposporium anguillulae*)、蠕虫埃丝特霉(*Esteya vermicola*)、明尼苏达被毛孢(*Hirsutella minnesotensis*)均具有杀线虫活性^[16-18],而蛋白酶在真菌杀线虫方面发挥重要作用^[19-21],因此研究钩丝孢属真菌的杀线虫能力及酶的作用十分必要。碳和氮是真菌生长过程中的重要营养物质,本研究结果表明,碳和氮都会影响菌株 H6 发酵产酶,其中氮源影响较为显著,尤其酵母提取物对蛋白酶活性影响最大,其次是蛋白胨。Ward 等^[22]在研究厚垣普可尼亚菌(*Pochonia chlamydosporia*)时发现,碳源会影响该菌株分泌丝氨酸蛋白酶 VCP1;Wang 等^[23]研究发现,加入氮源可使菌株的环境抗性增强,更有利于用菌株防治线虫。

发酵培养条件对生防真菌产酶具有重要影响,Wang 等^[24]研究发现,少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)产酶最适 pH 为 8.5;Wang 等^[25]研究发现,被毛孢 OWVT-1 在碱性条件下产酶活性较高,最适生长温度为 20~30℃;Ward 等^[22]研究发现,碱性条件下厚垣普可尼亚菌的产酶活性更高,且不同种属、不同菌株的最佳产酶条件有一定差异。钩丝孢属真菌 H6 在优化产酶培养基和发酵条件下

蛋白酶活性较优化前提高了 2.19 倍,具有较好的应用潜力,可作为开发寄生线虫病生物防治剂的候选菌株,但关于其侵染机制以及是否有其他物质的相互作用,还有待进一步研究。

4 结论

1) 筛选出 1 株钩丝孢属高产蛋白酶菌株 H6,该菌株发酵 5 d 蛋白酶活性最高,发酵 5~10 d 时发酵液的杀线虫活性较高。

2) 菌株 H6 的最佳产酶培养基成分为葡萄糖 8 g/L,明胶 8 g/L,蛋白胨 8 g/L,酵母提取物 4 g/L;最佳发酵培养条件为 pH 7.0、20℃、260 r/min、接种 2 块直径 5 mm 的菌块;在此优化条件下,菌株 H6 产蛋白酶活性大幅提高。

〔参考文献〕

- [1] Nyaku S T, Affokpon A, Danquah A, et al. Harnessing useful rhizosphere microorganisms for nematode control [M]//Shah M M, Mahamood M. Nematology-concepts, diagnosis and control. London: InTech, 2017: 153-182.
- [2] 金娜, 刘倩, 简恒. 植物寄生线虫生物防治研究新进展 [J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 789-800.
Jin N, Liu Q, Jian H. Advances on biological control of plant-parasitic nematodes [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(5): 789-800.
- [3] Li J, Zou C, Xu J, et al. Molecular mechanisms of nematode-

- nematophagous microbe interactions; basis for biological control of plant-parasitic nematodes [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2015, 53(53): 67-95.
- [4] 刘玉霞, 孟 丽, 漆永红, 等. 4 种药剂对豇豆根结线虫病的防治效果 [J]. *植物保护*, 2014, 40(4): 177-180.
- Liu Y X, Meng L, Qi Y H, et al. Control effect of four nematocides against cowpea root-knot nematode disease [J]. *Plant Protection*, 2014, 40(4): 177-180.
- [5] Tranier M S, Johan P J, Quiroz R D L C, et al. Commercial biological control agents targeted against plant-parasitic root-knot nematodes [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2014, 57(6): 831-841.
- [6] 李 娟, 张克勤. 食线虫微生物防控病原线虫的研究 [J]. *中国生物防治学报*, 2013, 29(4): 481-489.
- Li J, Zhang K Q. Research on nematophagous microorganisms for biological control of pathogenic nematodes [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 29(4): 481-489.
- [7] Shimazu M, Glockling S L. A new species of *Harposporium* with two spore types isolated from the larva of a cerambycid beetle [J]. *Mycological Research*, 1997(101): 1371-1376.
- [8] Li X, Luo H, Zhang K Q. A new species of *Harposporium* parasitic on nematodes [J]. *Canadian Journal of Botany*, 2005, 83(5): 558-562.
- [9] Wang C Y, Mo M H, Li X, et al. Morphological characteristics and infection processes of nematophagous *Harposporium* with reference to two new species [J]. *Fungal Diversity*, 2007(26): 287-304.
- [10] 汤丽燕, 杨 乐, 邢新婧, 等. 食线虫真菌致病相关丝氨酸蛋白酶的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 911-919.
- Tang L Y, Yang L, Xing X J, et al. Advances in pathogenicity-related serine proteases in nematophagous fungi [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 911-919.
- [11] Liu S Q, Meng Z H, Fu Y X, et al. Insights derived from molecular dynamics simulation into the molecular motions of serine protease proteinase K [J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2010, 16(1): 17-28.
- [12] Tian B Y, Li N, Lian L H, et al. Cloning, expression and deletion of the cuticle-degrading protease BLG4 from nematophagous bacterium *Brevibacillus laterosporus* G4 [J]. *Archives of Microbiology*, 2006, 186(4): 297-305.
- [13] 梁 萌, 祝晓蕊, 王新芳. 厚垣普可尼亚菌胞外蛋白酶的诱导及发酵液生化性质的研究 [J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(2): 211-216.
- Liang M, Zhu X R, Wang X F. Studies on extracellular proteins production and biochemical properties of the fermentation broth of egg parasitic fungus: *Pochonia chlamydosporia* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(2): 211-216.
- [14] 王 森. 食线虫真菌小舟单顶孢丝氨酸蛋白酶的分离纯化、性质研究及基因克隆 [D]. 昆明: 云南大学, 2005.
- Wang M. Purification, characteration and gene cloning of a serine protease from *Monacrosporium microscaphoides* [D]. Kunming: Yunnan University, 2005.
- [15] 李 珥. 粉红螺旋聚孢霉侵染性胞外蛋白酶的纯化、酶学性质及基因克隆 [D]. 昆明: 云南大学, 2005.
- Li J. Purification, characteration and gene cloning of an extracellular infection protease from *Clonostachys rosea* [D]. Kunming: Yunnan University, 2005.
- [16] Charles T P, Roque M V, Santos C D. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal cultures [J]. *International Journal for Parasitology*, 1996, 26(5): 509-519.
- [17] 王海华, 褚洪龙, 谢清哲, 等. 4 个蠕虫埃斯特菌菌株的产孢能力及对松材线虫的侵染活力 [J]. *林业科学*, 2016(9): 139-146.
- Wang H H, Chu H L, Xie Q Z, et al. Variation in sporulation of four *Esteya vermicola* isolates and their infectivity against pinewood nematode [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016(9): 139-146.
- [18] Shu C, Jiang X, Cheng X, et al. Genetic structure and parasitization-related ability divergence of a nematode fungal pathogen *Hirsutella minnesotensis* following founder effect in China [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 81: 212-220.
- [19] Cruz D G, Costa L M, Rocha L O, et al. Serine proteases activity is important for the interaction of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with infective larvae of trichostrongylids and free-living nematodes *Panagrellus* spp. [J]. *Fungal Biology*, 2015, 119(8): 672-678.
- [20] Braga F R, Soares F E, Giuberti T Z, et al. Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae [J]. *Veterinary Parasitology*, 2015, 212(3/4): 214-218.
- [21] Larriba E, Martinnieto J, Lopezllorca L V. Gene cloning, molecular modeling, and phylogenetics of serine protease P32 and serine carboxypeptidase SCP1 from nematophagous fungi *Pochonia rubescens* and *Pochonia chlamydosporia* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58(7): 815-827.
- [22] Ward E, Kerry B R, Manzanilla-López R H, et al. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene vcpl is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH; implications for nematode biocontrol [J]. *PLoS ONE*, 2013, 7(4): e35657.
- [23] Wang Z, Wang C Y, Gu L J, et al. Growth of *Esteya vermicola* in media amended with nitrogen sources yields conidia with increased predacity and resistance to environmental stress [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(10): 838-843.
- [24] Wang J W, Meng Q L, Qiao J. The recombinant serine protease, XAoz1, of *Arthrobotrys oligospora* exhibits potent nematocidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus* [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2013, 344(1): 53-59.
- [25] Wang B, Liu X Y, Wu W P, et al. Purification, characterization, and gene cloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode-endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis* [J]. *Microbiological Research*, 2009, 164(6): 665-673.