

白僵菌孢子和提取毒素对亚洲玉米螟 血淋巴蛋白质的影响

程 振 衡 邢 海 萍

(南开大学生物学系)

摘要 以白僵菌孢子和提取毒素感染亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 幼虫,引起血淋巴蛋白质含量降低,蛋白质凝胶电泳区带减少。无论是孢子感染或经饲喂和注入虫体毒素,试虫血淋巴中皆有不受毒作用影响的稳定性蛋白质存在。还可看出,培养液提取毒素对试虫血淋巴蛋白质的影响大于由菌粉提取的毒素。此外证实了提取毒素经贮存 7 年仍有毒效。

关键词 亚洲玉米螟 白僵菌 血淋巴蛋白质

白僵菌是昆虫的广谱性真菌病原,国内外做了不少有关研究。关于白僵菌的杀虫机理已有一些报道, Schaerffenberg (1957) 以感染白僵菌的蛴螬 *Melolontha* sp. 的丙酮提取物饲喂马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 发现具有明显的杀虫作用,并认为白僵菌的杀虫作用可能是毒素引起的。此后 Cermakova & Samsinakova (1960); Kodaira (1961); Broome 等(1976); Grula 等(1978)分别对白僵菌的杀虫机理做了进一步的研究。1969 年 Hamill 曾确定从白僵菌菌丝体中提取的毒素的结构式是一种环羧肽。

研究白僵菌孢子和毒素对昆虫的作用,可以深入了解白僵菌毒杀昆虫的作用机理,帮助人们选育效果较好的菌株。南开大学生物系昆虫教研室 1974 年曾以白僵菌孢子粉和培养液分别提取了白僵素,并利用这些提取毒素对粘虫等五种鳞翅目幼虫进行了注射和饲喂实验,均获得一定的效果(武汉化工 1976 年增刊,微生物农药专辑 15—20 页)。

本文以白僵菌孢子感染试虫,另以室内贮存已逾七年的提取毒素,经预试取得一定杀虫效果,以亚致死量进行实验,分别测定毒素对亚洲玉米螟幼虫血淋巴蛋白质的影响。

材 料 和 方 法

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 引自中国农业科学院植物保护研究所,依周大荣等(1980)配方配制人工饲料,在光照 L:D = 16:8, 温度 27—30℃, 湿度 80—90% 饲养,达一定虫期供试。

白僵菌提取毒素系南开大学生物系昆虫教研室 1974 年以白僵菌孢子粉和培养液提取的。

实验以三种方法进行:

孢子接触感染 选取 14 天的玉米螟幼虫使与白僵菌孢子自由接触 10 分钟,随后放回培养缸中继续饲养,12、24 和 48 小时后取试虫血淋巴供测试。

毒素饲养法 菌粉提取毒素和培养液提取毒素皆以 1:100 稀释, 分别加入人工饲料中, 含量为 500ppm, 饲喂 10 天的幼虫, 4 天后取试虫血淋巴供测试。

注射毒素法 菌粉提取毒素和培养液提取毒素稀释不同浓度, 对 10 天的幼虫每头注入 5 微升, 1—3 天后取试虫血淋巴供试。

昆虫血淋巴取样 用消毒解剖针将试虫腹足刺破, 将流出的血淋巴滴入干净的微形瓶中, 封口后置冰箱保存。为了防止血淋巴中酪氨酸的氧化, 在微形瓶中加入一定量的苯基硫脲(10 μ l 苯基硫脲/1ml 血淋巴)。

聚丙烯酰胺凝胶不连续圆盘电泳 凝胶浓度为 6%, 交联度 2.3%; 以血淋巴: 40% 蔗糖液: 溴酚蓝 = 1:4:1 的比例配制样本液, 以 9 μ l 的样本液注入电泳管(7cm $\times$ 0.5cm) 的凝胶顶端。电泳缓冲液, tris-甘氨酸 pH8.9, 电流强度 2mA/管, 泳动 2 小时, 将泳毕的凝胶剥出, 以 1% 氨基黑染色 1 小时, 以 7% 醋酸于 37 $^{\circ}$ C 水浴中脱色, 观察蛋白质区带变化。

Lowry 法测蛋白质含量: 以牛血清蛋白为标准蛋白, 用 721 一分光光度计, 于 540nm 测光密度值, 作标准曲线, 测算相同条件下血淋巴的蛋白质含量。

结 果

以白僵菌孢子感染 14 天玉米螟幼虫, 血淋巴蛋白质凝胶电泳图谱见图 1。从图中可以看出, 感染白僵菌孢子后 12、24 小时血淋巴蛋白质区带的变化甚微, 只有个别的区带

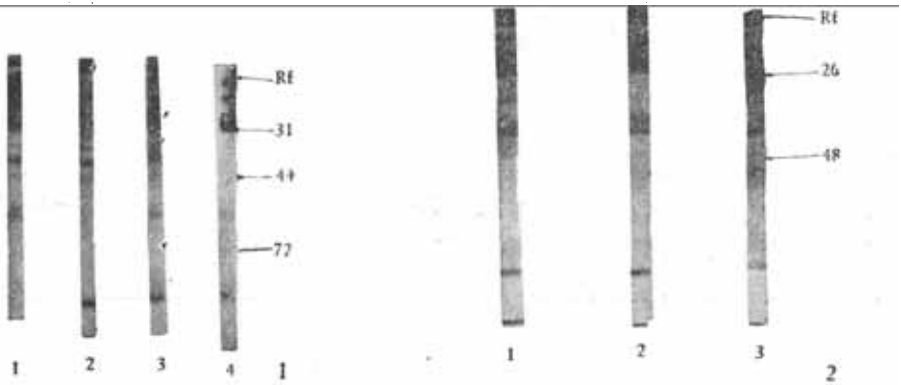


图 1 白僵菌孢子感染 14 天玉米螟幼虫后血淋巴蛋白质电泳图谱

1. 对照
2. 感染后 12 小时
3. 感染后 24 小时
4. 感染后 48 小时

图 2 饲料中加 500ppm 毒素饲喂 10 天的玉米螟幼虫, 4 天后血淋巴蛋白质电泳图谱

1. 对照
2. 菌粉提取毒素
3. 培养液提取毒素

减少了, 但感染后 48 小时血淋巴蛋白质区带发生了极明显的变化。因为白僵菌孢子接触玉米螟后有一个萌发和侵入虫体的阶段, 对虫体血淋巴不可能即刻产生影响, 不难看出血淋巴蛋白质区带的数目随着感染时间的推移而逐渐减少。此外还可看出, 血淋巴中 Rf31、Rf44 和 Rf72 三条区带是不受毒作用影响的稳定性蛋白质。

白僵菌毒素 1:100 稀释加于玉米螟幼虫人工饲料中, 含量为 500ppm, 饲喂 10 天的幼

虫，4 天后血淋巴蛋白质凝胶电泳图谱如图 2。不论菌粉提取毒素还是培养液提取毒素饲喂幼虫，对血淋巴蛋白质区带引起了微弱的变化，由于毒素含量较低，所以变化不够明显。同时还可看出血淋巴中 Rf26 和 Rf48 两条区带都出现在图谱中。

以菌粉提取毒素 1:500，1:100 和培养液提取毒素 1:100 对 10 天的玉米螟幼虫每头注入 5 微升，3 天后血淋巴蛋白质凝胶电泳图谱见图 3。结果表明因注入虫体毒素的浓度不同，血淋巴蛋白质区带的变化也不同，注入浓度大的虫体，血淋巴蛋白质区带减少的多些；还可看出注入菌粉提取毒素没有相同浓度培养液提取毒素的作用大。此外还表明注入毒素后血淋巴中 Rf26 和 Rf48 两条区带是不受毒作用影响的稳定性蛋白质。

另以 1:50 菌粉提取毒素对 10 天的玉米螟幼虫每头注入 5 微升，1 天后的血淋巴蛋白质凝胶电泳图谱示于图 4。表明高浓度的菌粉提取毒素，注入虫体后 24 小时即可看到试虫血淋巴蛋白质区带明显减少，同样 Rf26 和 Rf48 为稳定性蛋白质。

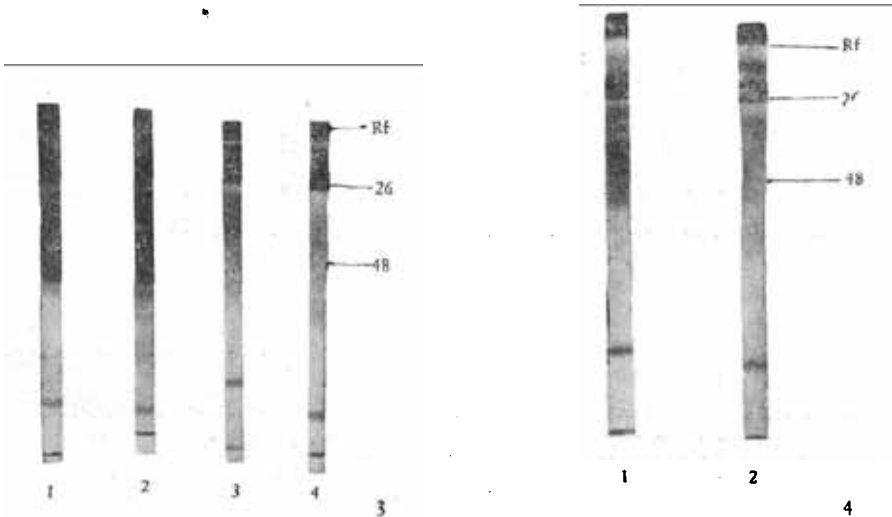


图 3 不同浓度毒素注入 10 天的玉米螟幼虫，3 天后血淋巴蛋白质电泳图谱
1.对照 2.1:500 菌粉提取毒素
3.1:100 菌粉提取毒素 4.1:100 培养液提取毒素

图 4 1:50 菌粉提取毒素，注入 10 天的玉米螟幼虫，1 天后血淋巴蛋白质电泳图谱

孢子感染或饲喂和注入不同提取毒素后一定时间，利用 Lowry 法分别测定试虫血淋巴蛋白质含量的变化，结果见表 1、表 2。

实验结果表明，14 天的幼虫感染白僵菌孢子后，48 小时血淋巴蛋白质含量为 0.74 克/100 毫升，而对照组为 1.05 克/100 毫升，由于感染白僵菌血淋巴蛋白质明显下降，此与幼

表 1 玉米螟 10 天幼虫饲喂提取毒素 7 天后血淋巴蛋白质含量变化

处理方法	浓度 (ppm)	血淋巴蛋白质含量 (克/100 毫升)
对 照		1.72
菌粉提取毒素	500*	1.83
培养液提取毒素	500*	1.68

* 原提取毒素 1:100 稀释后剂量。

表 2 玉米螟 12 天幼虫每头注入 5 微升不同浓度提取毒素 5 天后血淋巴蛋白质含量变化

处理方法	浓度 (ppm)	血淋巴蛋白质含量 (克/100 毫升)
对 照		1.58
菌粉提取毒素	1:100	1.74
菌粉提取毒素	1:50	0.89
培养液提取毒素	1:100	1.10

虫感染白僵菌后血淋巴蛋白质区带减少是相关的(图 1)。

表 1 表明人工饲料中加入 50ppm 毒素饲喂 10 天的幼虫, 7 天后血淋巴蛋白质含量无明显变化。

表 2 所示, 不同的提取毒素以不同浓度对 12 天的幼虫每头注入 5 微升, 5 天后血淋巴蛋白质含量的变化, 其中注入 1:100 菌粉提取毒素的幼虫, 血淋巴蛋白质的含量为 1.74 克/100 毫升, 略高于对照组(1.58 克/100 毫升); 而注入 1:100 培养液提取毒素的幼虫, 血淋巴蛋白质含量为 1.10 克/100 毫升, 比对照组明显降低; 注入 1:50 菌粉提取毒素的幼虫血淋巴蛋白质含量为 0.89 克/100 毫升, 显著地低于对照组。上述变化表明菌粉提取毒素对血淋巴蛋白质含量的影响不如同样浓度培养液提取毒素的作用大。

讨 论

实验结果表明 14 天的玉米螟幼虫感染白僵菌孢子, 24 小时血淋巴蛋白质变化不大, 48 小时血淋巴蛋白质区带明显减少, 蛋白质含量显著降低。10 天的幼虫每头注入 5 微升 1:50 菌粉提取毒素, 1 天后血淋巴蛋白质区带即显著减少, 相应也可看出注入毒素后试虫血淋巴蛋白质含量也明显降低(表 2)。所以孢子感染幼虫和直接注入虫体一定量毒素, 两者对玉米螟幼虫血淋巴引起的变化是相似的, 皆使血淋巴蛋白质区带减少, 蛋白质含量降低。

上述实验由于施用的方式不同, 具体的作用剂量不同, 检查的时间也不同, 因而血淋巴发生上述变化的程度有一定的差异, 但可表明白僵菌毒杀玉米螟幼虫是通过毒素起作用的。孢子感染幼虫, 一般要经过孢子萌发和侵入虫体的阶段, 所以 24 小时看到受染幼虫血淋巴蛋白质的变化不大; 48 小时后引起幼虫血淋巴蛋白质产生明显变化, 这是由于菌丝体已在虫体内增殖生长, 产生毒素引起的结果。这与直接注入虫体低剂量毒素后一定时间引起血淋巴蛋白质的变化性质完全相似, 表明两者对试虫的作用机理是类同的。无论是孢子感染或注入虫体毒素, 试虫血淋巴中皆有不受毒作用影响的稳定性蛋白质存在。

注入虫体毒素引起血淋巴蛋白质总量及区带变化时效很明显, 此因毒素直接注入虫体血腔, 一般可见速效, 因而是测试毒素作用机理的常规方法; 而以饲喂法测试, 往往需经一段时间始能发挥其作用, 且常因食入量不同而发生差异。本实验由于人工饲料中加入毒素剂量甚微, 引起效果不明显。

南开大学生物系昆虫教研室 1974 年提取的白僵菌毒素, 在室温条件下密封保存, 历经

7 年时间仍有毒效,表明这种毒素是比较稳定的,对今后开拓白僵素用于治虫是一个有利因素,在生产实践中是有意义的。

参 考 文 献

- 周大荣等 1980 玉米螟人工繁殖研究: 1. 一种半人工饲料及其改进. 植物保护学报 7(20): 113—21.
- Broome, J. R., et al. 1976 A mechanism of pathogenicity of *Beauveria bassiana* on larvae of the import fire ant, *Solenopsis richteri*. *J. Invert. Pathol.* 28: 87—92.
- Cermakova, A. & A. Samsinikova 1960 Über den Mechanismus des Durchdringens des Pilzes *Beauveria bassiana* Vuill. in die Larvae von *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Ceskosl. Parasitol.* 7: 231—6.
- Gula, E. A., et al. 1978 Biochemical basis for the pathogenicity of *Beauveria bassiana*. In "Proceedings of the first Joint U. S./USSR conference on the production, selection and standardization of entomopathogenic fungi of the U.S./USSR joint working group on the production by microbiological means" (C. M. Ignoffo, ed.) 192—216.
- Hamill R. L., et al. 1969 The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Atremia salina*. *Tetrah. Lett.* 49: 4255—8.
- Kodaira, Y. 1961 Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Facult. of Textile Science & Tech.* 1—68.
- Schaerffenberg, B. 1957 *Beauveria bassiana* (Vuill) Link als Parasit des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Anz. Schädlingkunde*, 30(5): 69—74.

CHANGES OF HAEMOLYMPH PROTEINS IN *OSTRINIA FURNACALIS* INFECTED WITH SPORES OR TOXINS OF *BEAUVERIA BASSIANA*

CHENG ZHEN-HENG XING HEI-PING

(Department of Biology, Nankai University)

Larvae of *Ostrinia furnacalis* were infected with spores of *Beauveria bassiana* or received its toxins through oral administration or injection into the body cavity and changes in the haemolymph proteins during the course of infection or intoxication were determined. The results showed that the total amount of haemolymph proteins declined and the electrophoretic bands decreased in the treated larvae as compared with the control. However, contact infection with spores would produce this effect after longer time than injection with isolated toxins. Same amount of the isolated toxins would produce less effect through oral administration than through injection. Toxins isolated from spore powder would produce less effect than that isolated from the subculture media. Some haemolymph proteins were not affected through either method of treatment, as seen in the result of electrophoresis. Some samples of the toxins of *Beauveria bassiana* used in the experiments have been isolated and preserved for more than seven years and they are still potent.

Key words *Ostrinia furnacalis*—*Beauveria bassiana*—haemolymph proteins