

嗜线虫致病杆菌北京变种 CB6 菌株杀虫蛋白对棉铃虫幼虫的生物活性

李明华 杨怀文 杨秀芬* 简 恒 刘 峥

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所,北京 100081)

摘要: 嗜线虫致病杆菌北京变种 *Xenorhabdus* var. *pekingensis* CB6 菌株是本研究室自主分离的新菌株,其代谢物对棉铃虫具有很强的拒食和抑制生长活性。为了进一步明确代谢物中杀虫蛋白的生物活性,作者用饲料染毒法和叶碟法测定了杀虫蛋白对棉铃虫不同龄期幼虫取食和生长发育的影响。结果表明,杀虫蛋白对棉铃虫幼虫有很强的抑制生长作用,用 64 $\mu\text{g/g}$ 含杀虫蛋白饲料饲喂初孵、1、2 和 3 龄幼虫 5 天的生长抑制率分别达 95.37%、92.73%、87.15% 和 88.64%,并明显延长幼虫发育历期,影响幼虫的化蛹及蛹的羽化。杀虫蛋白对 5 龄棉铃虫幼虫拒食效果明显,幼虫饲喂经 1.6mg/mL 杀虫蛋白处理的叶片 24h,选择性拒食率和非选择性拒食率分别为 76.22% 和 85.42%。当蛋白浓度为 0.32mg/mL 时,24h 选择性拒食和非选择性拒食率分别为 68.39% 和 74.75%。

关键词: 嗜线虫致病杆菌; 杀虫蛋白; 棉铃虫; 生长抑制; 拒食

Insecticidal activity of protein from *Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis* to *Helicoverpa armigera*

LI Ming-hua YANG Huai-wen YANG Xiu-fen* JIAN Heng LIU Zheng

(Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: *Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis* is a new strain separated and identified by authors. Its metabolite could inhibit insect larva feeding and growth. In order to illuminate the insecticidal activity of protein separated from the metabolite, the antifeeding and grow inhibition of the insecticidal protein to *Helicoverpa armigera* larvae were studied. The growth inhibitions were 95.37%, 92.73%, 87.15% and 88.64% while neonate and 1–3rd instar larvae were fed with artificial diet mixed with 64 $\mu\text{g/g}$ (v/w) protein. The insecticidal protein obviously decreased larva weight, prolonged larva stage and decreased the rate of pupation and emergence. When 5th instar larvae of *H. armigera* were fed with leaf dipped in 1.60mg/mL protein, the antifeeding was 76.22% and 85.42% respectively for choice and no-choice tests in 24h. The antifeeding was 68.39% and 74.75% while the insecticidal protein was 0.32mg/mL.

Key words: *Xenorhabdus nematophila*; insecticidal protein; *Helicoverpa armigera*; growth inhibition; antifeedins

1993 年 Ensign 首次报道了昆虫病原线虫共生菌胞外蛋白具有杀虫活性^[1],目前国内外已报道了多个菌株胞外蛋白的杀虫活性^[2-5]。CB6 菌株是本

研究室从 28 株昆虫病原线虫共生菌中筛选获得的高杀虫活性新菌株^[6],经鉴定属于嗜线虫致病杆菌北京变种 *Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis*^[7],

基金项目:国家自然科学基金(30070519);农业部生物防治重点开放实验室开放基金(LOBCR-01-03)

作者简介:李明华,男,1978 年生,硕士研究生,现工作单位为山东省科学院

* 通讯作者 Author for correspondence(email: Xiufeny@ejac.org.cn);收稿日期:2004-07-06

其代谢物对害虫具有很强的拒食和抑制生长作用^[8],并已从该菌株胞内分离出 1000KD 具有杀虫活性的复合蛋白^[9]。为了更好地将该菌株开发成植物保护剂及为杀虫蛋白分离、基因克隆等进一步研究奠定基础,作者就该菌株胞外蛋白对棉铃虫幼虫的生物活性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 初孵幼虫由中国农业科学院植物保护研究所棉虫组提供,室内于光照恒温恒湿培养箱中人工饲料培养,培养条件为 28℃、RH 70%、L:D 为 16:8,挑选龄期一致的幼虫用于生物测定。

1.2 杀虫蛋白的制备

将北京变种 CB6 菌株接种于基础培养基(胰蛋白胨 15g,蔗糖 10g,NaCl 5g,KH₂PO₄ 0.5g,H₂O 1000mL,pH7.2~7.4)中,28℃、180r/min 振荡培养 48h。发酵液经 4℃、8000r/min 离心后弃菌体取上清液,上清液置于冰浴中,加入 (NH₄)₂SO₄ 至终饱和度 85%,4℃静置过夜后,10000r/min 离心 20min,沉淀用 pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液溶解,透析 24h 后冷冻干燥,备用。

1.3 杀虫蛋白对棉铃虫初孵和 1~3 龄幼虫生长抑制的影响

将含杀虫蛋白 64μg/g 和 6.4μg/g 的人工饲料分别置于 24 孔养虫盘中,每孔接入 1 头已知体重的不同龄期幼虫,以不加杀虫蛋白的饲料为对照,每处理 16 头幼虫,重复 3 次,28℃人工气候箱培养 120h 后,称量存活幼虫的体重,计算生长抑制率。

生长抑制率(%) = [(对照体重增加量 - 处理体重增加量) / 对照体重增加量] × 100

1.4 杀虫蛋白对棉铃虫 4 龄幼虫后期生长发育的影响

方法同 1.3,观测对幼虫历期、化蛹及羽化的影响。试验设两个处理,处理 1 为幼虫自始至终饲喂含毒蛋白的饲料,处理 2 为幼虫喂食 2 天含毒蛋白饲料后转至饲喂正常饲料,以饲喂含 Tris-HCl 缓冲液的处理为对照,每处理 16 头幼虫,重复 3 次,每 4 天更换 1 次同样处理的人工饲料,逐日观察幼虫的发育状况,并分别在 48h 和 96h 取出幼虫称重,计算生长抑制率,统计幼虫历期、化蛹数、羽化数,并记录

蛹和成虫的畸变情况。

1.5 杀虫蛋白对棉铃虫 5 龄幼虫拒食的影响

采用叶碟法^[10],分别测定选择性拒食和非选择性拒食作用。非选择性拒食试验:将杀虫蛋白用 25mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液稀释成浓度为 1.6、0.32 和 0.032mg/mL 的蛋白溶液,并加入 Triton X-100 至终浓度为 0.02%,将新鲜平展的小白菜叶片剪成直径为 3.5cm 的圆形,分别在各浓度蛋白溶液中浸泡 2~3s,自然晾干后,将 4 片对照叶片和处理叶片分别置于直径为 15cm 的不同培养皿内,中央放置已饥饿 24h 的 5 龄棉铃虫幼虫 1 头,每处理重复 10 次,以 Tris-HCl 缓冲液作对照。选择性拒食试验:将处理叶片和对照叶片各 2 片均匀间隔置于同一培养皿内,中央放置已饥饿 24h 的 5 龄棉铃虫幼虫 1 头,每处理重复 10 皿。两种测定方法的试虫均置于 28℃、RH 为 70%、L:D 为 16:8 的人工气候箱中培养,并于 12h 和 24h 用坐标纸统计不同处理的取食叶面积,按以下公式计算拒食率。

选择性拒食率(%) = [(对照取食面积 - 处理取食面积) / (对照取食面积 + 处理取食面积)] × 100

非选择性拒食率(%) = [(对照取食面积 - 处理取食面积) / 对照取食面积] × 100

2 结果

2.1 杀虫蛋白对不同龄期棉铃虫幼虫生长的影响

CB6 菌株杀虫蛋白对棉铃虫幼虫的致死率较低,但具有极高的生长抑制作用。用含杀虫蛋白 64μg/g 的饲料喂食初孵、1~3 龄幼虫 5 天的生长抑制率分别为 95.37%、92.73%、87.15% 和 88.64%; 6.4μg/g 的杀虫蛋白,对各龄幼虫生长抑制率均在 70% 以上(表 1)。可见,杀虫蛋白对各龄棉铃虫幼虫有很强的生长抑制作用。

2.2 杀虫蛋白对棉铃虫幼虫后期发育的影响

杀虫蛋白对棉铃虫幼虫后期发育有显著影响(表 2),始终喂食含毒蛋白饲料(处理 1)的幼虫比仅喂食 2 天的幼虫(处理 2)所受的影响更大。由表 2 可以看出,处理 1 饲喂 2 天和 4 天后,生长抑制率由 55.55% 上升至 68.44%,而处理 2 由 52.14% 降至 37.75%,这是由于喂食 2 天含毒蛋白饲料后改喂正常饲料,幼虫可重新取食,导致幼虫体重增加,生长抑制率下降。但从幼虫后期发育看,尽管处理 2 仅喂 2 天含毒蛋白饲料,但对其后期发育产生强

表 1 杀虫蛋白对棉铃虫不同龄期幼虫生长的影响

Table 1 The effect of insecticidal protein on growth of *H. armigera*

龄期 Instar	处理 Treatment	杀虫蛋白 Insecticidal protein ($\mu\text{g/g}$)			
		64		6.4	
		体重增加量(mg) Increased weight	生长抑制率(%) Growth inhibition	体重增加量(mg) Increased weight	生长抑制率(%) Growth inhibition
初孵 Neonate	对照 CK	13.31 \pm 1.69	—	13.31 \pm 1.69	—
	处理 Treatment	0.62 \pm 0.06	95.37	2.64 \pm 0.43	80.17
1 龄 1st	对照 CK	21.98 \pm 0.74	—	21.98 \pm 0.74	—
	处理 Treatment	1.60 \pm 0.13	92.73	3.47 \pm 0.35	84.23
2 龄 2nd	对照 CK	45.37 \pm 2.02	—	45.37 \pm 2.02	—
	处理 Treatment	5.83 \pm 0.86	87.15	11.30 \pm 1.22	75.10
3 龄 3rd	对照 CK	81.07 \pm 3.70	—	81.07 \pm 3.70	—
	处理 Treatment	9.21 \pm 0.71	88.64	23.79 \pm 4.44	70.65

表 2 杀虫蛋白对棉铃虫后期发育的影响

Table 2 The effect of insecticidal protein on post-development of *H. armigera*

处理 Treatment	生长抑制率 Growth inhibition (%)		幼虫历期(d) Period of larva	化蛹率(%) Pupation rate	蛹重(mg) Pupal weight	羽化率(%) Emergence rate
	2d	4d				
对照 CK	—	—	8.08 \pm 0.34	81.25	217.5	84.6
处理 1 Treatment 1	55.55	68.44	14.87 \pm 0.72	0.00	—	—
处理 2 Treatment 2	52.14	37.75	10.82 \pm 0.43	52.10	178.9	60.0

烈的影响,幼虫化蛹率仅为 52.1%,比对照降低 35.87%;蛹重减轻 17.75%,蛹羽化率降低 29.08%,进一步观察得知,处理 2 所羽化的成虫中,多数成虫个体比对照小,展翅不良,这将最终影响成虫的产卵量。从表 2 可看出,始终饲喂含毒蛋白的处理 1,对幼虫发育历期、化蛹、蛹及羽化的影响更加明显,幼虫发育历期延长 7 天,所有幼虫均不能化蛹。

2.3 杀虫蛋白对棉铃虫 5 龄幼虫取食的影响

杀虫蛋白对棉铃虫 5 龄幼虫拒食作用较强(表 3,表 4)。幼虫饲喂经 1.6mg/mL 杀虫蛋白处理的叶片 12h 后,选择性和非选择性拒食率分别为 82.94% 和 85.88%;24h 后,拒食率分别为 76.22% 和 85.42%。随着杀虫蛋白浓度的降低,对棉铃虫的拒食率降低,当蛋白浓度为 0.032mg/mL 时,培养 12h 和 24h 后,选择性拒食和非选择性拒食率分别为 51.96%、45.81%、40.99% 和 61.37%。

表 3 共生菌杀虫蛋白对棉铃虫幼虫的选择性拒食作用

Table 3 The choice antifeeding activity of insecticidal protein against *H. armigera*

蛋白浓度 (mg/mL) Concentration	处理 Treatment	取食时间 Feeding time			
		12h		24h	
		取食面积(mm^2) Area of feeding	拒食率(%) Percent of antifeeding	取食面积(mm^2) Area of feeding	拒食率(%) Percent of antifeeding
1.600	对照 CK	643.40 \pm 61.53	—	1141.40 \pm 129.61	—
	处理 Treatment	59.90 \pm 9.11	82.94	154.40 \pm 25.26	76.22
0.320	对照 CK	557.80 \pm 41.60	—	1272.80 \pm 115.56	—
	处理 Treatment	102.60 \pm 19.25	69.16	238.00 \pm 15.72	68.39
0.032	对照 CK	532.60 \pm 77.18	—	1018.00 \pm 232.57	—
	处理 Treatment	172.20 \pm 49.02	51.96	361.20 \pm 28.99	45.81

表 4 共生菌杀虫蛋白对棉铃虫幼虫的非选择性拒食作用

Table 4 The non-choice antifeeding activity of insecticidal protein against *H. armigera*

浓度 (mg/mL) Concentration	取食时间 Feeding time			
	12h		24h	
	取食叶面积 (mm ²) Area of feeding	拒食率 (%) Percent of antifeeding	取食叶面积 (mm ²) Area of feeding	拒食率 (%) Percent of antifeeding
对照 CK	765.00 ± 69.95	—	1476.40 ± 224.78	—
1.600	108.00 ± 14.63	85.88	215.20 ± 27.79	85.42
0.320	257.20 ± 53.45	66.38	372.80 ± 82.89	74.75
0.032	451.40 ± 57.25	40.99	570.40 ± 92.59	61.37

3 讨论

植物保护剂属于害虫行为控制剂^[11,12],其作用首先是驱避害虫选择寄主,干扰成虫的产卵行为;然后干扰幼虫取食,包括逃避、拒食引起死亡;也可引起幼虫特别是初孵幼虫中毒死亡,这些干扰作用均能明显影响种群的增长。植物保护剂与杀虫剂的评价指标不完全相同,杀虫剂常常用死亡率作为杀虫毒力的指标,如 LD₅₀、LD₉₀、LT₅₀、LT₉₀,其它指标还有 AFC₅₀、PC₉₀等^[13]。赵善欢等^[14]认为以害虫着落率、拒食率、“校正累积虫日”和害虫总取食量来评价药效更全面、更科学。

以杀死害虫为目标的杀虫剂并不是害虫防治的唯一方式,更不是保护作物免受虫害的唯一方法。选择影响害虫行为的驱避物质,保护植物免受危害是植物保护的有效途径。本研究结果表明,嗜线虫致病杆菌北京变种产生的杀虫蛋白对棉铃虫初孵至3龄幼虫的生长抑制率高达80%以上,并且能显著减少幼虫化蛹率和蛹羽化率,进而达到降低种群数量、控制害虫种群发生发展的目的。研究表明,嗜线虫致病杆菌北京变种具有开发成植物保护剂的巨大潜力。

参考文献 (References)

- Ensign J C, Bowen D J, Bintrim S. Crystalline inclusion proteins and an insecticidal toxin of *Xenorhabdus luminescens* strain NC-19[A]. In: Proceedings and Abstracts of Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Society for Invertebrate Pathology. Microbial Control, Adelaide, 1990, p218
- Bowen D J, Ensign J C. Purification and characterization of a high-molecular weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 3029-3035
- Ffrench-Constant R H, Bowen D J. Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. Cellular and Molecular Life Science, 2000, 57(5): 828-833
- Bowen D J, Rocheiean T A, Blackburn M, et al. Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. Science, 1998, 280(26): 2129-2132
- 田世尧, 李素春, 王晓容, 等. 仲恺1号毒素对三种鳞翅目害虫的生物活性初报. 仲恺农业技术学院学报, 1993, 6(2): 74-75
- 刘峥, 简恒, 杨秀芬, 等. 致病杆菌和光杆状菌发酵液对几种害虫的生物活性. 植物保护学报, 2003, 30(3): 19-23
- 庞在堂, 杨怀文, 杨秀芬, 等. 一株高毒力致病杆菌 CB6 的鉴定. 微生物学报, 2004(2): 131-135
- 李明华, 杨秀芬, 简恒, 等. 嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株对小菜蛾幼虫生物活性的研究. 植物保护, 2003, 29(3): 15-17
- Pan Y H, Jian H, Yang X F. An intracellular protein (Xin) with remarkable inhibition on growth of *Helicoverpa armigera* was isolated from *Xenorhabdus nematophilus* strain BJ. Progress in Natural Science, 2002, 12(4): 310-312
- 王小艺, 黄炳球. 茶皂素对菜青虫的拒食作用方式及机制. 昆虫知识, 1999, 36(5): 277-281
- 庞雄飞, 张茂新, 侯有明, 等. 植物保护剂防治害虫效果的评价方法. 应用生态学报, 2000, 11(1): 108-110
- 庞雄飞. 植物保护剂与植物免害工程——异源植物次生化合物在害虫防治中的应用. 世界科技研究与发展, 1999, 21(20): 24-28
- Chiu S-F. Principles of insect toxicology. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press, 1993
- 赵善欢, 黄炳球, 胡美英. 几种楝科植物种核油的拒食作用实验. 昆虫学报, 1983, 26(1): 1-9