

研究报告

A54 外毒素与 Bt 毒蛋白对棉铃虫的交互作用

王立霞¹ 杨怀文¹ 黄大防²(中国农业科学院生物防治研究所 北京 100081)¹(中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)²

摘要: 研究测定了 A54 胞外毒素与 Bt 毒蛋白对棉铃虫的交互作用。结果发现随着棉铃虫饲料中 A54 外毒素浓度的增加, 棉铃虫幼虫的死亡率显著上升; 随着棉铃虫饲料中 Bt 毒蛋白浓度的增加, 棉铃虫幼虫的死亡率也显著上升。方差分析的结果表明二者互有增效作用。

关键词: A54 外毒素, Bt 毒蛋白, 交互作用, 棉铃虫

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0001-04

INTERACTIONS BETWEEN A54 TOXIN AND BT CRYSTAL PROTEIN
TO *HELCOVERPA ARMIGERA*WANG Li-Xia¹ YANG Huai-Wen¹ HUANG Da-Fang²(Institute of Biological Control CAAS, Beijing 100081)¹(Institute of Biotechnology CAAS, Beijing 100081)²

Abstract: Interactions between *Xenorhabdus bovienii* A54 oral toxin and Bt crystal protein were studied. With the increase of A54 toxin or Bt crystal protein in the larvae diet, mortality of *Helicoverpa armigera* larvae both increased significantly. The results of variance analysis suggested that there are synergism between A54 toxin and Bt crystal protein.

Key words: *Xenorhabdus bovienii* A54, *Bacillus thuringiensis*, Synergism, *Helicoverpa armigera*

昆虫病原线虫共生细菌属肠杆菌科细菌 (*Enterobacteriaceae*), 包含两个属——嗜线虫致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 和发光杆菌属 (*Photorhabdus*)。该菌存在于昆虫病原线虫的肠道内, 二者互惠共生。另外, 共生菌还可以在人工培养基上培养。

共生菌对昆虫有很强的致病力, 大部分共生菌注射到昆虫血腔内, 其 LD_{50} 仅为 1~10 个活细胞^[1]。研究发现, *P. luminescens* 的 w-14 菌株能产生高分子量的外毒素蛋白, 口腔饲喂发现, 该毒蛋白对鳞翅目、鞘翅目、膜翅目、蜚蠊目等几个目的多种害虫均表现出高的杀虫活性^[2]。有关昆虫病原线虫共生菌外毒素的研究, 目前已成为国际研究热点, 而国内报道很少。作者^[3]在对共生菌的十几个菌株杀虫活性的比较研究中发现, 伯氏致病杆菌 *X. bovienii* A54 菌株产生的外毒素对棉铃虫和玉米螟的初孵幼虫均有很高的胃毒活性, 而且该毒素对棉铃虫的二龄和三龄幼虫也有较好的杀虫活性。

目前, 生产上使用较多的细菌杀虫剂主要是苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*), Bt 的主要杀虫机制在于其产生的晶体蛋白, 昆虫食入该毒蛋白后, 在中肠高 pH 环境和蛋白水解酶的作用下, 蛋白晶体溶解并被激活, 破坏中肠上皮细胞, 导致昆虫的死亡^[4]; Bt 产品在防治鳞翅目害虫, 尤其在防治棉花的重要害虫——棉铃虫方面发挥了重要的

收稿日期: 2001-05-14, 修回日期: 2001-06-18

作用。昆虫病原线虫共生细菌的 A54 菌株, 是一种对棉铃虫有很好胃毒效果的病原细菌, 在其产生的外毒素的作用下, 昆虫中毒死亡。共生细菌作为一种新的杀虫资源, 研究其产生的胞外毒素与 Bt 毒蛋白对棉铃虫的交互作用, 将对未来生产中生物农药的合理使用有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试昆虫为室内人工饲养的棉铃虫初孵幼虫, 由中国农科院植保所棉虫组提供。

1.2 供试菌株

A54 菌株由中国农科院生防所线虫组提供。

1.3 A54 外毒素的提取制备

1.3.1 A54 菌株的培养: 将种管保存的共生菌, 划线于 NA 培养基平板上, 28℃ 培养 24~48h。挑取单菌落, 再划线于 NBTA 培养基平板上, 28℃ 培养 24~48h, 观察菌落的颜色变化以区分 I 型、II 型共生菌, 菌落为蓝色, 周围培养基的染料被吸收而变黄色的为 I 型菌; 菌落为红色, 周围培养基的染料不被吸收而保持蓝色的为 II 型菌^[1]。用接种环挑取 I 型菌, 接种于牛肉汤培养基, 28℃, 220r/min 振荡培养 16h, 再转接于同样的培养基中, 28℃, 220r/min 培养 48h, 备用。

NA 培养基: 营养琼脂 4.5g, 水 100mL, pH 7.2~7.4。

NBTA 培养基: 营养琼脂 4.5g, TTC (氯化三苯基四氮唑) 0.0025g, BTB (溴百里酚兰) 0.004g, 水 100mL, pH 7.2~7.4。

牛肉汤培养基: 牛肉蛋白胨 10g, 牛肉膏 3g, NaCl 5g, 水 1000mL, pH 7.2~7.4。

将培养基分装于三角瓶中, 15 磅灭菌 25min 备用。

1.3.2 A54 外毒素的提取: 上述 48h 的培养物经 10,000r/min 4℃ 离心 10min, 弃菌取上清液; 在上清液中加入硫酸铵至 85% 的饱和度, 4℃ 静置 4h; 10,000r/min 离心 10min, 离心后的沉淀用少量的去离子水稀释, 在去离子水中透析 (透析袋截留分子量为 10kD), 冷冻干燥, 所得干粉即为杀虫粗提物, -20℃ 贮存备用。方法参考文献[5]。

1.4 供试 Bt 毒蛋白

Bt 毒蛋白由中国农科院植保所生物技术组提供, 基因型为 *cry1Ac*; 该蛋白用碱裂解法从菌株 HD-73 中提取, 纯度达 90%。

1.5 A54 外毒素与 Bt 毒蛋白对棉铃虫的交互作用

将不同浓度的 A54 外毒素 (0、0.002%、0.004%、0.008%) 和不同浓度的 Bt 毒蛋白 (0、0.004%、0.008%、0.012%) 随机组合, 均匀拌入棉铃虫的人工饲料中, 然后将棉铃虫的初孵幼虫接入含有饲料的养虫盒内, 放于 26℃ 养虫室, 每组重复 4 次, 每个重复接虫 10 头, 于 96h 检查棉铃虫的死亡情况。该试验共重复了两次。

1.6 结果的统计分析

生测结果采用方差分析的方法来进行显著性分析。

2 结果与分析

两次重复试验均于 96h 检查棉铃虫的死亡情况, 得到不同处理棉铃虫幼虫的死亡率。棉铃虫幼虫的死亡率为百分数, 属于二项分布。按照统计学要求, 应进行正弦代

换,使其符合正态分布,才能进行方差分析。把棉铃虫幼虫死亡率进行统计转换: $X = \sin^{-1}\sqrt{p}$ (x : 代换后的角度值, p : 棉铃虫幼虫死亡率), 得到表 1。

表 1 A54 外毒素与 Bt 毒蛋白对棉铃虫的交互作用*

A54 外毒素 浓度 (%)	Bt 蛋白浓度 (%)	重复 I				重复 II			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
0	0	26.56	26.56	0	0	26.56	0	0	0
	0.004	26.56	50.77	39.23	50.77	26.56	50.77	39.23	39.23
	0.008	39.23	50.77	56.79	63.43	39.23	50.77	56.79	56.79
	0.012	50.77	63.43	56.79	63.43	50.77	56.79	56.79	63.43
0.002	0	33.21	56.79	33.21	33.21	33.21	50.77	33.21	33.21
	0.004	45	56.79	33.21	33.21	45	50.77	33.21	33.21
	0.008	50.77	56.79	56.79	63.43	56.79	56.79	56.79	56.79
	0.012	63.43	63.43	63.43	63.43	56.79	63.43	63.43	63.43
0.004	0	50.77	56.79	56.79	63.43	56.79	56.79	56.79	56.79
	0.004	56.79	63.43	63.43	63.43	56.79	63.43	63.43	63.43
	0.008	63.43	63.43	63.43	71.57	63.43	63.43	63.43	71.57
	0.012	56.79	71.57	71.57	71.57	63.43	71.57	71.57	71.57
0.008	0	63.43	71.57	63.43	63.43	63.43	63.43	63.43	63.43
	0.004	71.57	71.57	63.43	71.57	63.43	71.57	71.57	71.57
	0.008	71.57	71.57	90	71.57	71.57	71.57	90	90
	0.012	90	90	90	71.57	90	90	90	90

* 表中数据为各组死亡率的反正弦值

对表 1 的数据进行统计分析, 结果见表 2。

表 1、表 2 结果可以看出, 随着 A54 外毒素浓度的增加, 棉铃虫幼虫的死亡率明显上升, A54 外毒素对棉铃虫幼虫的毒杀作用达到极显著水平 ($F_1 = 34.77$, $F_2 = 99.30$); 随着棉铃虫饲料中 Bt 毒蛋白浓度的增加, 棉铃虫幼虫的死亡率显著上升, Bt 毒蛋白对棉铃虫的毒杀作用达到极显著水平 ($F_1 = 20.72$, $F_2 = 57.82$)。

由表 1 的实验数据可以看出, 以重复 I 为例, 加入 A54 外毒素后, Bt 毒蛋白对棉铃虫幼虫的杀虫效果明显得到增强。以含有 0.002% A54 外毒素的 Bt 毒蛋白的杀虫效果与不含 A54 胃毒素的杀虫效果进行比较 (见图 1), 可以看出, 棉铃虫的人工饲料中未加 A54 外毒素时, 0.004% 的 Bt 毒蛋白只能致死 45% 的棉铃虫幼虫; 加入 0.002% 的 A54 外毒素, 棉铃虫幼虫的死亡率便达到 62.5%。

加入 Bt 毒蛋白后, A54 外毒素对棉铃虫幼虫的杀虫效果也明显得到增强。以含有 0.004%

表 2 交互作用试验结果的方差分析

变异来源	F_1 值	F_2 值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
A54 外毒素	34.77**	99.30**	3.19	5.08
Bt 毒蛋白	20.72**	57.82**	3.19	5.08
A54 外毒素 × Bt 毒蛋白	2.17*	5.72**	2.08	2.80

注: ** 表示方差分析极显著, * 表示方差分析显著, F_1 值、 F_2 值分别代表试验重复 I、II 方差分析所得 F 值

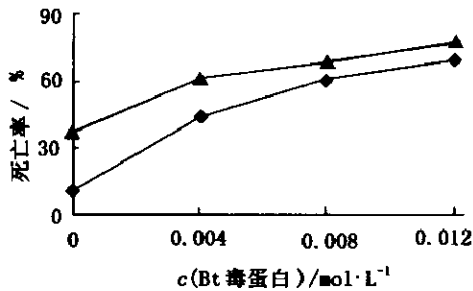


图 1 A54 毒素对 Bt 毒蛋白杀虫活性的影响
◆ Bt, ▲ Bt + A54

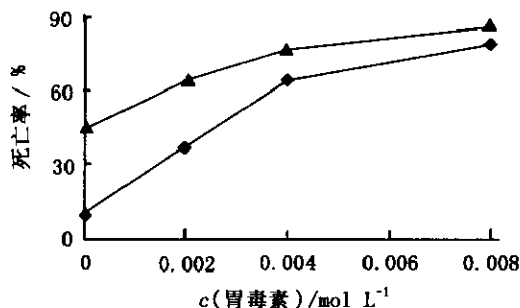


图2 Bt毒蛋白对A54外毒素杀虫活性的影响

◆ A54, ▲ A54 + Bt

度的增加, 它们对棉铃虫幼虫的致死作用增强, 这些结果说明 A54 外毒素与 Bt 毒蛋白彼此互有增效作用。

3 小结与讨论

本章研究结果表明, 随着棉铃虫饲料中 A54 外毒素和 Bt 毒蛋白浓度的增加, 棉铃虫幼虫的死亡率均显著上升, 而且 A54 外毒素与 Bt 毒蛋白彼此互有增效作用, 所以二者任意一方可作为另一方的增效剂。Bt 已是广泛使用的杀虫剂, 昆虫病原线虫共生细菌作为一种具有杀虫作用的新的生物资源, 将来有望成为一种新的生物杀虫剂在生产中使用, 由于双方互有增效作用, 因而我们可将二者合理混配来使用, 这样可以增强彼此的杀虫效果, 达到更为有效防治靶标害虫的目的。

参考文献

- [1] Akurst R J. J Gen Microbiol, 1980, 121: 303 ~ 309.
- [2] Bowen D J, Rocheleau T A, Blackburn M, et al. Science, 1998, 64 (8): 3029 ~ 3035.
- [3] 王立霞, 潘映红, 杨怀文, 等. 昆虫学报, 2000 (增刊), 98 ~ 103.
- [4] 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 高级生物化学实验选编. 北京: 高等教育出版社, 1989.

的 Bt 毒蛋白的 A54 外毒素的杀虫效果与不含 Bt 毒蛋白的杀虫效果进行比较 (见图 2), 可以看出, 棉铃虫的人工饲料中未加 Bt 毒蛋白时, 0.002% 的 A54 外毒素只能致死 37.5% 的棉铃虫幼虫; 加入 0.004% 的 Bt 毒蛋白, 棉铃虫幼虫的死亡率便达到 65%。

方差分析的结果表明, A54 外毒素与 Bt 毒蛋白之间有交互作用, F_1 (交互) = 2.17 > $F_{0.05} = 2.08$, F_2 (交互) = 5.72 > $F_{0.01} = 2.80$; 又由于随着二者浓