

· 研究论文 ·

不同基质传代白僵菌对桑天牛幼虫的侵染力 与寄主血淋巴酚氧化酶活性的关系

李会平*, 黄大庄, 杜邵华, 苏筱雨

(河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000)

摘要:以诱集自土壤中、对桑天牛 *Apriona gemari* 幼虫具有较高致病性的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* Bb00 为出发菌株 R_0 , 经反复接种桑天牛幼虫分别获得菌株 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 , 而通过反复在普通查氏培养基上传代分别获得菌株 M_1 、 M_2 、 M_3 和 M_4 。分别用 R_0 、 R_2 、 R_4 和 M_2 、 M_4 接种桑天牛幼虫, 发现在普通培养基上传代会导致菌株致病力降低, 而通过桑天牛幼虫传代培养可提高菌株的致病力。桑天牛幼虫感染白僵菌后, 其免疫互作使酚氧化酶活性先迅速上升, 随后因菌株的适应性增强而开始下降。用菌株 M_2 、 M_4 接种桑天牛幼虫后, 其血淋巴酚氧化酶活性比接种 R_2 和 R_4 的高。各菌株引起的桑天牛幼虫酚氧化酶活性出现高峰值的时间与其 LT_{50} 值具有一定的相关性, 反映了各菌株不同的侵染速度; 同时各菌株引起的酚氧化酶活性高峰值也与其 LC_{50} 值高度相关。说明桑天牛幼虫血淋巴中酚氧化酶活性与不同菌株对桑天牛幼虫的毒力具有一定的相关性, 同时酚氧化酶活性也可作为反映菌株毒力的一个重要参考指标。

关键词:白僵菌; 桑天牛; 侵染力; 酚氧化酶活性

中图分类号: S481.1; S482.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)02-0221-05

Relationship between the Infectivity of Different Subculturing Isolates of *Beauveria bassiana* on *Apriona gemari* Larvae and the Phenoloxidase Activity in Hemolymph of *Apriona gemari* Larvae

LI Huiping*, HUANG Da-zhuang DU Shao-hua SU Xiao-yu

(College of Forestry, Agricultural University of Hebei Baoding 071000 China)

Abstract A strain of *Beauveria bassiana* Bb00, isolated from the soil was used as the original isolate R_0 . Isolates R_1 , R_2 , R_3 and R_4 were obtained by repeatedly inoculating the *A. gemari* larvae with R_0 , and isolates M_1 , M_2 , M_3 and M_4 were obtained by repeatedly growing R_0 on Czapek medium. Isolates R_0 , R_2 , R_4 and M_2 , M_4 were tested for their infectivity to the *A. gemari* larvae. The results showed that the pathogenicity of the successive isolates M_2 , M_4 to the *A. gemari* larvae reduced, while that of the isolates R_0 , R_2 and R_4 increased. The phenoloxidase activity (POA) in hemolymph of *A. gemari* larvae infected by *B. bassiana* increased with in the early days of infection because of the immunoreaction, then decreased because of the adaptability of *B. bassiana*. The POA in hemolymph of *A. gemari* larvae infected by successive isolates obtained from Czapek medium was higher than that recovered from *A. gemari*

收稿日期: 2007-12-11; 修回日期: 2008-03-26

作者简介: * 李会平 (1975-), 女, 河北新乐人, 通讯作者 (Author for correspondence), 博士, 讲师, 主要从事林木害虫综合治理工作. 联系电话: 13930201360 E-mail: huiping1@sohu.com

基金项目: 河北省自然科学基金 (2007000486) 资助

larvae. There were some correlations between the time producing maximal phenoloxidase activity and the LT_{50} value of different isolates which reflects different infective speed. At the same time, a close relationship between the maximal activity and the LC_{50} value was also found. All this indicated that the phenoloxidase activity in the hemolymph of *A. gemari* larvae can not only weigh the immunity ability of the host in the process of *B. bassiana* infection, but also act as an important reference index of the pathogenicity of *B. bassiana*.

Key words *Beauveria bassiana*; *Apriona gemari*; infectivity; phenoloxidase activity

桑天牛 *Apriona gemari* 是多种林木、果树、花卉的重要蛀干害虫,也是我国危害最严重、最难防治的害虫之一。近年来,其猖獗危害已成为我国养蚕业、林业及果树种植业等经济发展的严重障碍。白僵菌 *Beauveria bassiana* 是重要的昆虫病原微生物,笔者等^[1]从诱集自土壤中的 9 株白僵菌中初步筛选出了对桑天牛幼虫具有较高致病性的 Bb00 菌株,发现该菌株多次在普通查氏培养基上传代后其致病力明显下降,再经过多次重新接回到桑天牛幼虫虫体后其致病力又有所提高。这说明多次在寄主昆虫上传代后,该菌株对寄主的适应性有可能逐渐增强,从而使其致病力也逐渐提高。但有关这种现象的作用机制目前还未见报道。

病原真菌侵入昆虫体壁后主要在血腔中繁殖而使虫体僵硬死亡,其成功侵染必须克服寄主血淋巴的免疫防御^[2,3],其中,逃避寄主免疫识别是病菌成功侵染的重要途径^[4~6]。在昆虫免疫防御中,酚氧化酶原激活系统起着关键作用,如细胞免疫中包囊作用和结节形成过程常伴随着黑色素的沉积,而黑色素的形成与血淋巴中酚氧化酶和底物的作用有关;体液免疫过程中更会产生钝化或杀死入侵病原物的酚氧化酶。在昆虫体内,酚氧化酶是以无活性的酚氧化酶原形式存在的,这种无活性的酚氧化酶原只有在受到病原微生物产生的细胞壁成分如昆布多糖等的诱导激活后才能转化为有活性的酚氧化酶,它们继而吸附于病原菌表面,与底物作用后产生黑化并限制其入侵^[7~11]。因此菌株入侵寄主过程中酚氧化酶活力高低在一定程度上反映了它们逃避寄主免疫识别的能力。笔者研究了不同基质传代白僵菌菌株对桑天牛幼虫侵染力的变化与其侵染后寄主血淋巴酚氧化酶活力变化的关系,以明确白僵菌是否通过多次桑天牛幼虫传代而获得逃避寄主免疫识别的能力从而增强了对桑天牛幼虫的致病力。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

野外捕捉桑天牛 *Apriona gemari* 成虫,利用 1~2 a 生幼嫩桑枝进行室内饲养,产卵后 10 d 左右剖取已孵化的桑天牛幼虫,人工接种到河北农业大学标本园内的毛白杨枝条中,以见蛀屑和虫粪排出确认成活。

1.2 供试菌株

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* Bb00 菌株为诱集自土壤中、对桑天牛幼虫具有较高致病性的菌株,由河北农业大学林学院森林保护教研室提供。以此为出发菌株 R_0 ,以每毫升含 8.00×10^8 个孢子的悬浮液接种桑天牛幼虫,从病死虫尸中分离获得第一代桑天牛传代菌株 R_1 ,再用 R_1 接种桑天牛幼虫后分离获得菌株 R_2 ,同法依次获得第三、第四代桑天牛传代菌株 R_3 和 R_4 。同时,将相同浓度 R_0 菌株接种在查氏培养基上,待其产孢后获得第一代培养基传代菌株 M_1 ,再将 M_1 菌株接种在查氏培养基上,待其产孢后获得菌株 M_2 ,同法依次获得第三、第四代培养基传代菌株 M_3 和 M_4 。

1.3 不同传代方式对白僵菌致病力的影响测定

将 R_0 、 R_2 、 R_4 和 M_2 、 M_4 菌株分别用含 0.1% 吐温-80 的无菌水配成每毫升含 1.00×10^8 个孢子的孢子悬液,将供试 20 日龄桑天牛幼虫浸入孢子悬液中 30 s 后,接入毛白杨枝条中。以 0.1% 吐温-80 无菌水处理作对照。逐日定时观察记录幼虫死亡情况,虫尸保湿培养。每天检查,统计死亡率,以 Abbott 公式计算校正死亡率,对照死亡率低于 5% 时不作校正。每处理 3 次重复,每重复 20 头试虫。采用机率值分析法计算毒力回归方程及致死中时 LT_{50} 值。

将各菌株用含 0.1% 吐温-80 的无菌水配成 5 种浓度的孢子悬液,每毫升分别含: 1.00×10^5 、 1.00×10^6 、 1.00×10^7 、 1.00×10^8 和 8.00×10^8 个孢子,以 0.1% 吐温-80 溶液处理为对照,接种、饲

养和观察记录方法同上。采用机率值分析法计算毒力回归方程及致死中浓度 LC_{50} 值。

1.4 酚氧化酶活性测定

用不同白僵菌菌株接种 2 月龄桑天牛幼虫, 分别于接种后 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5 d 后提取血淋巴, 4℃ 下 800 g 离心 3 min 取上清液。每处理 3 次重复。将收集的上清液在 4℃ 下、10 mmol/L 的二甲砷酸钠缓冲液 (pH 值 7.0) 中透析 1 h, 用 Bradford 检测法测定血淋巴蛋白的浓度, 即以考马斯亮蓝 G-250 染色后在紫外分光光度计上测定样品的 OD_{595} 值, 并以结晶牛血清蛋白作为标准绘制标准曲线^[12]。

在 300 μ L、3 μ g/L 多巴溶液中加入血淋巴 100 μ L, 于室温下反应 10 min 在 490 nm 下测定 OD 值, 并以多巴溶液为对照。每个样品重复 3 次。酶活性以每分钟每毫克蛋白 OD_{490} 的变化 ($OD_{490} / \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Pro}$) 来表示^[13]。

2 结果与分析

2.1 不同基质传代菌株对桑天牛幼虫的致病力

通过不同基质传代后各菌株对桑天牛幼虫的致病情况见表 1。

表 1 不同基质传代菌株对桑天牛幼虫的致病力

Table 1 The pathogenicity of different successive reisolates of Bb00 on *A. gemari* larvae

菌株 Isolates	校正死亡率 Corrected mortality (%)						LT ₅₀ /d	LC ₅₀ ($\times 10^6$) /(个 μ L)
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d		
R ₀	0.00	0.00	25.00	47.37	63.16	77.78 B	4.13 B	3.05 C
R ₂	0.00	0.00	30.00	47.37	68.42	77.78 B	4.01 B	1.47 B
R ₄	0.00	20.00	45.00	57.89	73.68	94.44 A	3.23 A	0.686 A
M ₂	0.00	0.00	10.00	36.84	47.37	66.67 C	4.78 C	7.94 D
M ₄	0.00	0.00	0.00	5.26	15.79	33.33 D	6.34 D	9.58 E

注: 表中具有不同大写字母者表示在 0.01 水平差异显著。

Note: Data followed by different capital letters mean the significantly different at 0.01 level.

由表 1 可以看出, 各菌株对桑天牛幼虫均表现出了一定的致病力, 但随时间的延长, 接种不同菌株的幼虫死亡率不同, 其中接种经桑天牛幼虫传代的 R₄ 菌株后第 2 d 即开始有 20% 的死亡率, 而接种经查氏培养基传代的 M₄ 菌株后第 4 d 仅有 5.26% 的死亡率。另外, 接种 R₂、R₄ 菌株的桑天牛幼虫的校正死亡率大于接种 M₂、M₄ 菌株的, 而且在实验范围内, 通过桑天牛幼虫传代次数越多, 校正死亡率越高, 而通过查氏培养基传代次数越多, 校正死亡率越低。

接种 R₂、R₄ 菌株后的致死中时小于接种 M₂、M₄ 菌株的, 而且通过桑天牛幼虫传代次数越多, 致死中时越短, R₄ 菌株的致死中时仅为 3.23 d 为原始 R₀ 菌株的 0.78 倍。而通过查氏培养基传代次数越多, 致死中时越长, M₂ 和 M₄ 菌株的致死中时显著大于原始菌株和通过桑天牛幼虫传代的菌株。

以桑天牛幼虫作为基质的传代菌株的致死中浓度远远低于经查氏培养基传代的菌株, 而且通过桑天牛幼虫传代的次数越多, 致死中浓度越低, R₄ 菌株的 LC_{50} 值仅为每毫升 0.686×10^6 个孢子,

为原始菌株的 0.22 倍, 是 R₂ 菌株的 0.47 倍。相反, 在查氏培养基上传代次数越多, 致死中浓度越高, M₄ 菌株的 LC_{50} 值为每毫升 9.58×10^6 个孢子, 是原始菌株的 3.14 倍, M₂ 菌株的 1.21 倍。

2.2 桑天牛幼虫感染不同基质传代白僵菌后酚氧化酶活性变化

桑天牛幼虫接种经不同基质传代的白僵菌后其血淋巴酚氧化酶活性在不同时间的变化情况见表 2。

从表 2 可以看出, 接种白僵菌后, 不同时间段桑天牛幼虫的血淋巴酚氧化酶活性差异显著, 且均出现了一个酶活性峰值, 随后酶活性开始下降。接种不同菌株后酶活性峰值出现的早晚不同, R₀、R₂、R₄、M₂ 和 M₄ 菌株处理分别第 2.5、2.1、2.5 和 3.5 d 出现峰值, 这恰好与各菌株的侵染速率一致。同时, 接种不同菌株后, 桑天牛幼虫同期血淋巴酚氧化酶活性也有差异, 其中, 接种 M₄ 菌株的最高, 接种 R₄ 菌株的最低。即接种经普通培养基连续传代的白僵菌的幼虫其血淋巴酚氧化酶活性显著高于接种经桑天牛幼虫连续传代者。

表 2 接种不同基质传代白僵菌后桑天牛幼虫血淋巴酚氧化酶活性

Table 2 Pheno b x ilase activity (POA) in hem o l y m p h of *A. gem ari* larvae after infected by different isolates of *B. bassiana*

接种后天数 Days after inoculation /d	酚氧化酶活性 Phenolox idase activity/(OD ₄₉₀ ·m in ⁻¹ ·m g ⁻¹ Pro)				
	R ₀	R ₂	R ₄	M ₂	M ₄
0	2.51 Dd	2.55 Cc	2.53 Bb	2.54 Ed	2.54 Fe
1	3.02 Cc	2.83 Bbc	2.9 Aa	3.24 CD bc	3.33 Ed
1.5	2.95 Cc	2.94 Bb	2.1 Cc	3.23 CD bc	3.76 Dc
2	3.76 Bb	3.76 Aa	1.65 Dd	3.78 Bb	4.02 Cc
2.5	4.54 Aa	2.84 Bbc	1.61 Dd	4.67 Aa	4.89 Bb
3	2.29 DEde	2.11 Dd	0.87 Ee	3.32 Cbc	4.92 Bb
3.5	2.06 Ede	1.57 EFef	0.46 Ff	3.42 Cbc	5.34 Aa
4	1.88 Ee	1.77 Ee	0.78 Eef	2.85 DEcd	3.78 Dc
4.5	2.00 Ede	1.36 Ff	0.79 Eef	2.09 Fe	2.65 Fe
5	2.10 Ede	0.72 Gg	1.01 Ee	1.97 Fe	2.22 Gf

注:表中具有不同小写字母者表示在 0.05 水平差异显著,具有不同大写字母者表示在 0.01 水平差异显著。

Note: Data followed by different small and capital letters mean the significantly different at 0.05 and 0.01 levels respectively.

2.3 感染白僵菌后桑天牛幼虫血淋巴中酚氧化酶活性与菌株毒力的相关性

不同菌株的致死中浓度和致死中时间与桑天牛幼虫被感染后血淋巴中酚氧化酶活性变化的关系见表 3。

将各菌株产酶高峰期出现的时间(天数)与对桑天牛幼虫的 LT₅₀ 值进行回归分析,相关系数为 0.940(其中 R² = 0.884, F = 22.789, P = 0.017, 回归方程为 Y = -0.989 + 0.731x)。

将各菌株的产酶高峰期(酶活性)与对桑天牛幼虫的 LC₅₀ (Log₁₀) 进行回归分析,相关系数为 0.961(其中 R² = 0.924, F = 36.465, P = 0.009, 回归方程为 Y = 4.364 + 0.497x)。

结果表明,桑天牛幼虫血淋巴中酚氧化酶活性与不同菌株对桑天牛幼虫的毒力具有一定的相关性:菌株的 LC₅₀ 值越大,则桑天牛幼虫感染后其酚氧化酶活性越高,而 LT₅₀ 值越大,则桑天牛幼虫感染后其酚氧化酶活性高峰期出现的时间越晚。

表 3 感染白僵菌不同菌株后桑天牛幼虫血淋巴中酚氧化酶产酶水平与菌株毒力的关系

Table 3 Relationships between pheno b x ilase activity level of *A. gem ari* larvae infected with different isolates of *B. bassiana* and virulence against the *A. gem ari* larvae

菌株 Iso lates	LT ₅₀ /d	LC ₅₀ (×10 ⁶) /(个/mL)	Log ₁₀	产酶高峰期	
				Maximal activity/(OD ₄₉₀ ·m in ⁻¹ ·m g ⁻¹ Pro)	Maximal time/d
R ₀	4.13	3.05	6.484	4.54	2.5
R ₂	4.01	1.47	6.167	3.76	2
R ₄	3.23	0.686	5.836	2.90	1
M ₂	4.78	7.94	6.900	4.67	2.5
M ₄	6.34	9.58	6.981	5.34	3.5

3 讨论

传代实验表明,在查氏培养基上连续传代会导致菌株致病力的降低,而通过桑天牛幼虫传代培养则会提高菌株的致病力,这也正是菌株保存中虫体复壮的生物学基础。但这种致病力的提高只是在实验范围内的数据和结果,其能否随着传代培养次数的继续增多而逐渐增长,以及在虫体

复壮中最佳的传代或复壮次数等还有待进一步研究。

本研究中经培养基数次传代后的白僵菌接种桑天牛幼虫后引起的血淋巴酚氧化酶活性比经桑天牛幼虫传代后的高,说明白僵菌经过多次侵染寄主桑天牛幼虫后,逐渐获得了克服并逃避寄主免疫识别的能力。当菌株入侵时,通常会有一个酚氧化酶活性高峰期出现,如 R₀ 菌株处理在第

2.5 d R₂ 菌株在第 2 d R₄ 菌株在第 1 d M₂ 菌株在第 2.5 d M₄ 菌株处理在第 3.5 d 分别达到高峰, 而后开始下降, 表明寄主在遭受真菌入侵时受到一定的损伤, 其免疫互作使酚氧化酶活性先迅速上升, 但随后因菌株的适应性增强而开始下降。白僵菌侵染能力的大小在很大程度上取决于其逃避或克服寄主免疫防御的能力。本研究中, 各菌株引起的桑天牛幼虫酚氧化酶活性出现高峰值的时间与各菌株的 LT₅₀ 值具有一定的相关性, 反映了各菌株不同的侵染速度; 同时各菌株引起的桑天牛幼虫血淋巴酚氧化酶活性高峰值也与 LC₅₀ 值高度相关。因此, 笔者认为, 寄主血淋巴中酚氧化酶活性不仅是衡量其入侵过程中免疫防御能力的一个重要指标, 同时也可作为在菌株筛选中反映侵染力大小的重要参考因素。

参考文献:

- [1] LI Hui-ping(李会平), HUANG Da-zhuang(黄大庄), WANG Xiao-hong(王晓红), et al 用黄粉虫诱集法分离球孢白僵菌及对桑天牛幼虫高毒力菌株的筛选 [J]. *Acta Sericologica Sinica* (蚕业科学), 2006 32(3): 320-323.
- [2] ASOKAN R, ARUMUGAM M, MULLA NADHAN P. Functional Analysis of Plasma Prophenoloxidase System in the Marine Mesopodema viridis [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 120A: 753-762.
- [3] BUTT T M, WRIGHT S P, GALANHWRIGHT S, et al Humoral Encapsulation of the Fungus *Erwinia radicans* (Entomophthorales) by the Potato Leafhopper *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) [J]. *J Invertebr Pathol*, 1988, 52: 107-111.
- [4] HAJEK A E, STEIGER R J Interactions between Fungal Pathogenesis and Insect Hosts [J]. *Annu Rev Entomol*, 1994, 39: 293-322.
- [5] YU X Q, ZHU Y F, MAC, et al Pattern Recognition Proteins in *Vanduca sexta* Plasma [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32: 1287-1293.
- [6] LI Juan(李娟), XU Jun-huan(徐均焕), FENG Ming-guang(冯明光). 大菜粉蝶根虫瘟霉菌株转染小菜蛾后侵染力变化及其与寄主血淋巴酚氧化酶活性的关系 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2004, 47(5): 567-572.
- [7] LIU Qing-e(刘青娥), XU Jun-huan(徐均焕), FENG Ming-guang(冯明光). 根虫瘟霉不同菌株对小菜蛾幼虫血淋巴酚氧化酶原的激活作用 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2004, 47(4): 434-438.
- [8] HUNG S Y, BOUCIAS D G. Phenoloxidase Activity in Hemolymph of *Naïve* and *Beauveria bassiana*-Infected *Spodoptera exigua* Larvae [J]. *J Invertebr Pathol*, 1996, 67: 35-40, 234.
- [9] WENS M, KOZDL C, BATEL R, et al Phenylalanine Hydroxylase from the Sponge *Geodia cydonium*: Implication for Allorecognition and Evolution of Aromatic Amino Acid Hydroxylases [J]. *Dev Comp Immunol*, 1998, 22: 469-478.
- [10] ABORES F V, PLASCENCIA G Y. Beta Glucan Binding Protein and its Role in Shrimp Immune Response [J]. *Aquaculture*, 2000 191: 13-21.
- [11] SILVA C, DUNPHY G B, RAU M E. Interaction of Hemocytes and Prophenoloxidase System of Fifth Instar Nymphs of *Achetia domestica* with Bacteria [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24: 367-379.
- [12] BRADFORD M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle Protein-dye Binding [J]. *Anal Biochem*, 1976 72: 248-254.
- [13] BIDOCHKA M J, KHACHATO HACHATOURIANS G G. Protein Hydrolysis in Grasshopper Cuticles by Entomopathogenic Fungal Extracellular Proteases [J]. *J Invertebr Pathol*, 1994 63: 7-13.

(Ed TANG J)