

2 种拟青霉代谢产物对烟蚜乙酰胆碱酯酶 和羧酸酯酶的影响*

杨 斌, 李桐森, 王晓波, 何美军
(西南林学院 资源学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 以粉拟青霉菌的 sw03032 菌株和玫烟色拟青霉菌的 sw03085 为研究对象, 比较其代谢产物的杀蚜虫活性和对烟蚜乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶活性的影响. 结果表明 2 种真菌发酵液含有能毒杀蚜虫的毒素物质, 且毒素粗提物浓度越大, 杀蚜活性越强. 经玫烟色拟青霉菌不同浓度毒素粗提液处理的蚜虫乙酰胆碱酯酶比活力分别比对照(CK2)降低了 70.4%~29.8%. 不同浓度玫烟色拟青霉菌毒素粗提液处理 12 h 后, 蚜虫羧酸酯酶比活力分别比对照(CK2)降低 79.5%~44.4%. 用不同浓度粉拟青霉菌毒素粗提液处理烟蚜 12 h 后, 乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶活性分别降低了 38%~18.6% 和 51.6%~59.5%. 玫烟色拟青霉菌的 sw03085 菌株代谢产物对烟蚜的伤害活性明显较粉拟青霉菌 sw03032 菌株代谢产物高.

关键词: 粉拟青霉; 玫烟色拟青霉; 毒素; 乙酰胆碱酯酶; 羧酸酯酶

中图分类号: Q 936 文献标识码: A 文章编号: 0258-7971(2005)02-0166-04

现有的研究表明粉拟青霉菌(*Paecilomyces farinosus*)和玫烟色拟青霉菌(*P. fumosoroseus*)是 2 种重要的昆虫病原菌, 同时又是世界分布的土壤习居菌, 具有适应性强、杀虫活性高和寄主范围广的特点, 在世界各国都颇受重视^[1~3]. 但是, 由于这 2 种真菌孢子致病性受环境因子(温度、湿度、紫外线)影响大, 难以大规模的应用. 近年的研究发现这 2 种真菌在人工培养条件下都能够产生对昆虫有毒杀活性的代谢产物, 并且有学者认为有毒代谢产物是这 2 种真菌能够迅速杀死寄主的主要原因^[2,4]. 但是, 到目前为止, 研究者还没有分离出杀虫毒素, 也缺乏对该类真菌杀虫机理的充分认识. 因此, 研究该类真菌的杀虫毒素的活性和作用机理对今后的开发利用具有重要的意义. 本研究以从粉拟青霉菌的 sw03032 菌株和玫烟色拟青霉菌的 sw03085 为研究对象, 比较其杀虫毒素的毒力和对烟蚜乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶活性的影响, 为评价

和利用这 2 种真菌奠定基础.

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

(1) 供试菌株 粉拟青霉菌的 sw03032 菌株和玫烟色拟青霉菌的 sw03085 均由西南林学院微生物实验室提供.

(2) 供试烟蚜 试验用烟蚜采自云南省宜良县.

(3) 试剂 碘化硫代乙酰胆碱, Carl Roth KG 公司产品; 5, 5-二硫代双-2-硝基苯甲酸(DTNB)和固兰 B 盐, Fluka 公司产品, 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 液体发酵与代谢产物提取 采用目前昆虫病原菌培养使用较多的培养液(萨氏培养液, SDB): 葡萄糖 4%, 蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%. 用 3 mL 无菌水将 PDA 试管菌种的孢子洗下, 接种于

* 收稿日期: 2004-12-01

基金项目: 云南省“十五”攻关项目资助(2002NG04); 昆明市科技局项目资助(200243).

作者简介: 杨 斌(1971-), 男, 四川人, 博士, 主要从事微生物发酵和代谢产物研究.

装有 300 mL 培养基的三角瓶中, 置于 150 r/min 的摇床上振荡培养, 培养温度(25+1) °C, 培养时间 96 h. 发酵产物用双层滤纸抽滤除去菌丝得培养滤液. 取 300 mL 培养滤液在 60 °C 下, 经旋转蒸发器抽真空蒸发至干得到代谢产物, 分 3 次加入 600 mL 甲醇充分提取, 滤去甲醇不溶物, 抽真空挥去甲醇得毒素粗提物.

1.2.2 生物检测 将感染蚜虫的烟叶剪成小片, 每片烟叶上保留 30 头健壮的无翅蚜虫. 置于保湿培养皿中, 将生物检测液喷洒于蚜虫上. 分别于 12 h 和 24 h 检查蚜虫死亡数量, 计算死亡率. 用清水和不接菌的培养基为对照.

1.2.3 2 种拟青霉菌代谢产物杀蚜活性比较 取 300 mL 粉拟青霉菌培养滤液的毒素粗提物, 分别加入 50, 100, 150, 300, 450 mL 无菌水溶解, 获得不同浓度的毒素粗提液分别称为 A 液、B 液、C 液、D 液、E 液. 按同样方法制备不同浓度的玫烟色拟青霉菌的毒素粗提液, 分别称为 a 液、b 液、c 液、d 液、e 液. 用于生物检测, 比较 2 种虫生真菌代谢产物的杀蚜活性.

1.2.4 代谢产物对蚜虫乙酰胆碱酯酶的影响 采用 FAO^[5] 推荐的浸液法处理蚜虫. 用不同浓度的毒素粗提液处理 30 头蚜虫, 处理后移至干净、健康的烟叶上饲养, 一定时间后挑下虫体置于研钵中, 加入 2 mL 冰浴过的蒸馏水和少量石英砂, 充分研磨成匀浆(冰浴), 匀浆液经 3 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为酶液.

蚜虫乙酰胆碱酯酶活性测定参照 Gorun^[6] 的方法进行, 酶反应总体积为 3 mL, 其中含有 2.6 mL 0.1 mol/L pH 8.0 的磷酸缓冲溶液, 0.01 mol/L 的 5, 5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸(DTNB) 0.1 mL, 0.075 mol/L 的碘化硫代乙酰胆碱 50 μL, 酶液 0.25 mL, 以磷酸缓冲液替代酶液作为空白. 混合液置于 37 °C 下保温 15 min, 保温过程中振荡反应液 1~2 次. 15 min 后加入 0.1 mL 1 mmol/L 的毒扁豆碱终止反应, 用紫外分光光度计在 412 nm 波长下测定吸收值. 同时参照 Bradford^[7] 的方法测定蚜虫匀浆液蛋白质的含量, 以便计算酶的比活力.

1.2.5 代谢产物对蚜虫羧酸酯酶的影响 蚜虫处理、酶液的制备同 1.2.3. 本实验测定 α-乙酸萘

酯酶的活性, 测定方法参照邱立红^[8] 的方法. 反应体系包含 0.4 mL 磷酸缓冲溶液(pH 7.0, 0.04 mol/L), 3.25 mL α-乙酸萘酯(3×10^{-4} mol/L), 0.1 mL 1 mmol/L 的毒扁豆碱, 0.25 mL 酶液. 反应温度 30 °C, 反应 10 min 后, 加入 1 mL DBLS 试剂(1% 固兰 B 与 5% 十二烷基硫酸钠以 2:5 的比例混合), 15 min 后在 600 nm 波长下测定吸收值. 同时参照 Bradford^[7] 的方法测定蚜虫匀浆液蛋白质的含量, 以便计算酶的比活力.

2 实验结果与分析

玫烟色拟青霉 sw03085 菌株和粉拟青霉菌 sw03032 菌株在供试培养基上能够迅速生长, 24 h 以后就可见大量菌丝出现, 菌丝均匀分散, 72 h 以后发酵液呈粘糊状, 显微镜观察可见 2 种虫生真菌在该培养条件下菌丝较短, 有大量的节孢子出现; 玫烟色拟青霉发酵液颜色由最初的淡黄色逐渐变为黄色, 浅棕色, 72 h 以后发酵液为紫红色. 发酵液 pH 值由最初的 5.2 变为 3.7; 粉拟青霉菌发酵液颜色也是逐渐加深, 由淡黄色变为棕黄色. 发酵液 pH 值由 5.3 降至 4.4. 发酵液颜色和 pH 值的差异从一个侧面反映出即使是在相同的培养条件下, 这 2 种虫生真菌代谢产物有所不同.

2.1 2 种真菌代谢产物杀蚜活性比较 试验结果见表 1.

实验显示, 粉拟青霉菌 sw03032 菌株和玫烟色拟青霉菌 sw03085 菌株的发酵液含有能毒杀蚜虫且能溶解于甲醇的活性物质, 毒素粗提物浓度越高, 杀蚜活性越强. 所试验的不同浓度的毒素粗提液对蚜虫都表现出明显的毒杀活性, 而对照处理的蚜虫死亡率低于 10%. 浓缩 6 倍和 3 倍的毒素粗液(A 液、B 液、a 液、b 液) 在 12 h 内对蚜虫的致死率可达 60% 以上, 24 h 致死率可达 100%. sw03085 菌株毒素粗提液 c 液对蚜虫的致死率在 24 h 也可达 100%, 而相同处理的 sw03032 菌株粗提液 C 液 24 h 内对蚜虫的致死率为 76%. 同样, 来自 sw03032 菌株的 D 液和经过稀释 E 液, 对蚜虫的致死率也明显低于来自 sw03085 菌株的 d 液和 e 液. 这一结果表明在 SDB 培养液中, 玫烟色拟青霉菌 sw03085 产毒能力明显高于粉拟青霉菌 sw03032 菌株.

表 1 2 种真菌不同浓度代谢产物对烟蚜的毒杀效果

Tab. 1 Virulent effect of different concentration metabolites from the two *Paecilomyces* spp

玫烟色拟青霉菌	12 h 死亡率/ %	24 h 死亡率/ %	粉拟青霉菌	12 h 死亡率/ %	24 h 死亡率/ %
a 液	77	100	A 液	73	100
b 液	78	100	B 液	62	100
c 液	64	100	C 液	37	76
d 液	36	64	D 液	24	47
e 液	27	43	E 液	8	19
SBD(CK1)	3	7	SBD(CK2)	3	7
清水(CK2)	0	3	清水(CK2)	0	3

2.2 2 种真菌代谢产物对烟蚜乙酰胆碱酯酶的抑制作用 试验结果见图 1, 图 2.

12 h 以后, 经玫烟色拟青霉菌不同浓度毒素(A 液、B 液、C 液、D 液、E 液)处理的蚜虫乙酰胆碱酯酶比活力分别比对照(CK2)降低了 70.4%, 68.3%, 63.9%, 57.1%, 29.8% (见图 1). 经粉拟青霉菌毒素粗提液(a 液、b 液、c 液、d 液、e 液)处理 12 h 后, 蚜虫乙酰胆碱酯酶比活力分别比对照(CK2)降低 38%, 32.6%, 35.2%, 28.7%, 18.6% (见图 2). 从图 1 和图 2 还可看出: 毒素浓度越高, 对酶的抑制作用越强; 同一毒素浓度在 12 h 之内, 处理时间越长, 酶活性越低; 玫烟色拟青霉菌发酵产物对烟蚜乙酰胆碱酯酶的抑制活性明显高于粉拟青霉菌的代谢产物; 而同清水相比培养基 SDB(CK1)对烟蚜乙酰胆碱酯酶没有明显抑制作用.

2.3 2 种真菌代谢产物对烟蚜羧酸酯酶的抑制作用 2 种拟青霉菌毒素对烟蚜羧酸酯酶的抑制试

验结果表明(图 3, 图 4): 这 2 种昆虫病原菌代谢产物都能够抑制烟蚜羧酸酯酶的活性, 且毒素浓度越高, 对酶的抑制作用越强; 同一毒素浓度处理时间越长, 酶活性越低; 玫烟色拟青霉菌发酵产物对烟蚜羧酸酯酶的抑制活性明显高于粉拟青霉菌的代谢产物; 而同清水相比培养基 SDB(CK1)对烟蚜羧酸酯酶没有明显抑制作用. 在 12 h 以内, 供试不同浓度玫烟色拟青霉菌毒素粗提物溶液对烟蚜羧酸酯酶的抑制活性可达 79.5% ~ 44.4%, 不同浓度的粉拟青霉菌毒素粗提物溶液对烟蚜羧酸酯酶的抑制率在 51.6% ~ 59.5% 之间.

3 结论与讨论

目前已知的大多数杀虫剂都是作用于昆虫神经系统的神经毒剂. 乙酰胆碱酯酶是昆虫体内的一种重要酶类, 其作用是水解乙酰胆碱(重要的神经传递物质), 使其成为乙酸和胆碱.

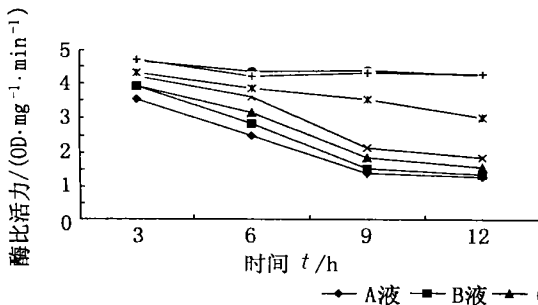


图 1 玫烟色拟青霉粗毒素对烟蚜乙酰胆碱酯酶的抑制效果

Fig. 1 Inhibited effects of crude toxins from *P. fumosoroseus* on acetylcholinesterase of tobacco aphides

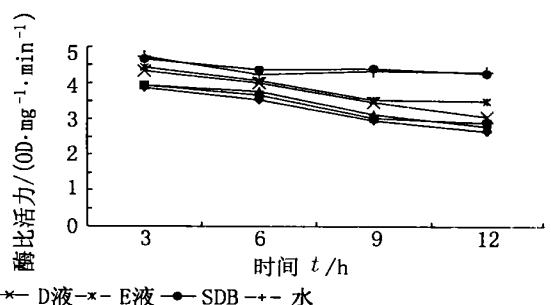


图 2 粉拟青霉菌毒素粗提液对烟蚜乙酰胆碱酯酶的作用效果

Fig. 2 Inhibited effects of crude toxins from *Paecilomyces farinosus* on acetylcholinesterase of tobacco aphides

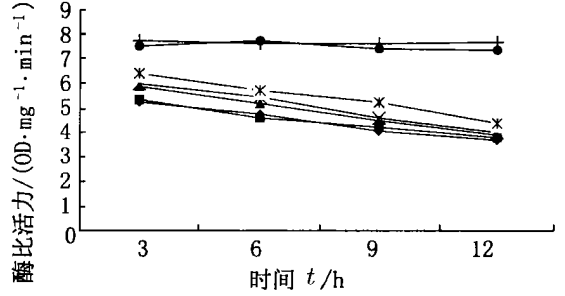
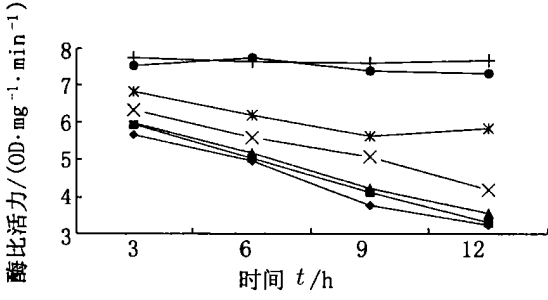
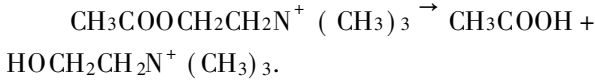


图 3 玫烟色拟青霉菌毒素粗提液对羧酸酯酶活性的影响

图 4 粉拟青霉菌对羧酸酯酶活性的影响

Fig. 3 Inhibited effects of crude toxins from *P. fumosoroseus* on carboxylesterase of tobacco aphides

Fig. 4 Inhibited effects of crude toxins from *Paecilomyces farinosus* on carboxylesterase of tobacco aphides



乙酰胆碱是昆虫化学传递必需的, 但是它在释放后必须迅速分解, 否则该物质的积累反而会引起神经传递的阻断. 因此, 抑制乙酰胆碱酯酶活性就会引起神经传导的阻断, 影响昆虫生理生化过程失调和破坏, 导致昆虫死亡. 试验的 2 种拟青霉菌都能够抑制烟蚜乙酰胆碱酯酶活性, 而且玫烟色拟青霉菌代谢产物对烟蚜酶的抑制活性高于粉拟青霉菌, 这与玫烟色拟青霉菌代谢产物的杀虫活性更强是一致的. 对烟蚜乙酰胆碱酯酶的抑制可能是烟蚜死亡的重要原因.

本研究证实, 这 2 种拟青霉菌代谢产物都能抑制烟蚜羧酸酯酶, 这可能在生产上有重要意义. 羧酸酯酶是昆虫体内的一种重要解毒酶, 其活性与昆虫解毒能力密切相关, 它的存在是昆虫产生抗药性的重要机制. 抑制该酶活性, 降低起解毒能力可延长外源物质在昆虫体内存在的时间, 充分发挥毒效作用, 有利于提高昆虫的死亡率. 这个现象提示人们可以将这 2 种昆虫病原菌代谢产物与其他杀虫物质混用发挥增效作用.

参考文献:

[1] TIGANO M M S, HONEYCUTT R J, LACEY L A, et

al. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1995, 65: 274—282.

[2] 陈巍巍, 冯明光. 玫烟色拟青霉的研究与应用现状[J]. 昆虫天敌, 1999, 21(3): 140—144.

[3] 武甄文. 应用粉拟青霉防治松毛虫[J]. 安徽农业大学学报, 1996, 23(3): 438—445.

[4] 姚丽娟. 寄主真菌代谢产物杀虫效果简报[J]. 昆虫天敌, 1996, 18(1): 42—43.

[5] F A O. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides FAO plant production and protection paper[Z]. 1980, 21: 25—28.

[6] GORUN V. Modified ellman procedure for assay of cholinesterase in crude enzymatic preparation[J]. Analytical Biochem, 1978, 86: 324—326.

[7] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Analytical Biochem, 1976, 72: 248—254.

[8] 邱立红, 李学锋. 抗溴氰菊酯在不同用药方式下的敏感性变化及其机制[J]. 昆虫学报, 1999, 42: 248—256.

The research of biodiversity for the species of phytoplankton in Dianchi Lake, Kunming, China

ZHANG Mei, LI Yuan, WANG Ruσnan

(School of Life Science, University of Yunnan, Kunming 650091, China)

Abstract: Phytoplankton species composition and biodiversity in Dianchi Lake during 6 months from September 2001 to July 2002 were surveyed. Biodiversity calculations included Shannon index, Pielou index and Berger-Parker index. The results showed that 106 species and varieties of phytoplankton had been identified in the Lake. The biodiversity of phytoplankton was the highest in March, but no difference was found during the rest months. The biodiversity of phytoplankton in the southern part of the lake was higher than that in the northern, and it also higher in the east than in the west.

Key words: Dianchi Lake; phytoplankton; species composition; biodiversity

* * * * *

(上接第 169 页)

Impacts of metabolites from *Paecilomyces farinosus* and *P. fumosoroseus* on acetylcholinesterase and carboxylesterase of tobacco aphides

YANG Bin, LI Tongsen, WANG Xiaobo, HE Meijun

(School of Source, Southwest Forestry College, Kunming 650224, China)

Abstract: Two isolates, sw03032 (*Paecilomyces farinosus*) and sw03085 (*P. fumosoroseus*), were cultured in SDB media. The metabolites were extracted to study the pesticidal activities and impacts on acetylcholinesterase and carboxylesterase. The results indicated the two isolates could produce active compounds to poison tobacco aphides and reduce activities of the two important enzymes. Compared with CK2, in 12 h, activities of acetylcholinesterase and carboxylesterase treated with different concentration crude toxins from sw03085 could reduce to 70.4% —29.8% and 79.5% —44.4% respectively. Treated with different concentration crude toxins from sw03032, activities of acetylcholinesterase and carboxylesterase could reduce to 38% —18.6% and 51.6% —59.5% respectively. Poisonous roles of the toxins from sw03085 (*P. fumosoroseus*) to tobacco aphides were evidently higher than the toxins from sw03032 (*P. farinosus*).

Key words: *Paecilomyces farinosus*; *P. fumosoroseus*; toxins; acetylcholinesterase; carboxylesterase