

嗜线虫致病杆菌杀虫毒素对棉铃虫幼虫 几种酶活性的影响

史翠红, 宋 萍, 王勤英, 杨 君, 崔 龙, 孔繁芳

(河北农业大学 植物保护学院, 河北省农业病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001)

摘要: 毒素Ⅱ是从嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株分离得到的一种具有胃毒杀虫活性的复合蛋白毒素。本研究以该毒素口服饲喂棉铃虫 4 龄幼虫, 检测了毒素Ⅱ对棉铃虫生长发育的影响, 并通过生化分析研究其对棉铃虫幼虫体内几种酶活力的影响。结果表明: 饲喂拌有毒素Ⅱ人工饲料的棉铃虫 4 龄幼虫一化蛹历期为 6.65 d, 比对照明显推迟 2 d, 毒素Ⅱ对棉铃虫幼虫化蛹有明显的抑制, 毒素Ⅱ饲喂的幼虫化蛹率为 62%, 取食对照幼虫的化蛹率为 98%, 并且处理组蛹的平均体重也受到明显的抑制, 比对照蛹的平均体重降低 106.47 mg, 两者差异显著; 在饲毒 12 h 后棉铃虫幼虫中肠弱碱性类胰蛋白酶、强碱性类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶和总蛋白酶活性分别受到抑制, 到 36 h 饲毒幼虫与对照几种蛋白酶活性差异达到最大, 分别为对照幼虫酶活性的 0.370 8、0.190 3、0.328 2 和 0.214 1 倍; 饲毒 12 h 后毒素Ⅱ开始诱导棉铃虫幼虫体内羧酸酯酶、酯酶活性和乙酰胆碱酯酶的活性, 3 种酶的活性均在 36 h 达到最高, 分别为对照的 15.66、9.49、6.38 倍。

关键词: 嗜线虫致病杆菌; 棉铃虫; 蛋白酶; 解毒酶; 乙酰胆碱酯酶

中图分类号: S482 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)03-0105-06

Effects of the Protein Toxin from *Xenorhabdus nematophila* on Several Enzymatic Activities of the *Helicoverpa armigera* Larvae

SHI Cui hong, SONG Ping, WANG Qin ying, YANG Jun, CUI Long, KONG Fan fang
(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biocontrol Center of Plant Diseases and
Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract: Toxin II, isolated from the cell of *X. nematophila* HB310, was an oral insecticidal protein complexes. The effects of the toxin II on the growth disrupting and several enzymatic activities of the *Helicoverpa armigera* larvae were investigated. The results indicated that the larvae period from 4th instar to pupae was 6.65 d, it remitted 2 d as compared with that of control. And the pupation rate was inhibited by toxin II, the pupation rate of the treated reached 62%. The average weight of pupae was 106.47 mg, it was significantly less than that of control. The activities of weak alkaline trypsin like enzyme, active alkaline trypsin like enzyme, chymotrypsin like enzyme and total protease in the toxin treated midgut were inhibited significantly at 36 h, which were 0.370 8, 0.190 3, 0.328 2 and 0.214 1 times of those of the control respectively. On the other hand, the activities of carboxylesterase, esterase and acetylcholinesterase in the toxin treated midgut were peaks at 36 h, which were 15.66, 9.49 and 6.38 times than those of the control respectively.

Key words: *Xenorhabdus nematophila*; *Helicoverpa armigera*; Protease; Detoxicating enzyme; Acetylcholinesterase

棉铃虫(*Helicoverpa armigera* Hübner)属鳞翅目夜蛾科, 是一种危害极大的世界性农业害虫, 也是我国棉区的主要害虫之一。而长期的化学防治已使棉铃虫对拟除虫菊酯、有机磷、氨基甲酸酯等多种农药产

生了不同程度的抗性^[1]。另外, 随着 Bt 生物制剂的大量使用及表达 Bt 毒素的转基因植物的大面积种植加速了棉铃虫抗性的发展^[2], 因此亟待筛选和开发新的杀虫毒素并提供更多样化的生防微生物, 来

收稿日期: 2006-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30400296); 河北省自然科学基金项目(C2006000443); 河北省农业大学重点基金项目(9816)

作者简介: 史翠红(1981-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事昆虫病原微生物研究

通讯作者: 王勤英(1962-), 女, 河北藁城人, 博士, 教授, 主要从事昆虫病原微生物及害虫生物防治的研究。

有效的减少棉铃虫对农业造成的危害。

嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*)是与线虫(*Steinemema carpocapsae*)互惠共生的细菌,二者联合可以侵染和杀死多种昆虫,这类线虫—共生菌复合体早已被作为生防制剂应用于生产中。尽管在昆虫病原线虫—共生菌复合体的杀虫过程中,共生菌是关键致病因子,但是在自然状态下,由于共生菌在土壤和水中均不能存活,而携带共生菌的侵染期线虫仅在遇到昆虫血淋巴后才会释放共生菌,共生菌仅能在昆虫血腔中繁殖^[3-5],并且该复合体仅适合于防治地下害虫,对叶面害虫无效。

Bowen 等^[6-7]从发光杆菌(*Photobacterium luminescens*)W14 的胞外分泌物中分离纯化出具有极高口服杀虫活性的毒蛋白,引起了人们的广泛关注。随后人们发现 *X. nematophila*, *X. bovinei* 等多种共生菌在离体培养中都能产生具有很高的胃毒杀虫活性的蛋白,并且其杀虫谱较 *Bt* 菌广^[8]。昆虫病原线虫共生菌口服杀虫蛋白及其基因的发现和研究为共生菌在害虫生物防治中的应用开辟了一条新的途径,昆虫病原线虫共生菌有可能直接作为生防制剂用于防治叶面害虫,其杀虫基因也可能像 *Bt cry* 基因一样用于培育转基因抗虫植物。

嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株是从小卷蛾斯氏线虫(*S. carpocapsae* HB310)体内分离获得的共生菌,将共生菌的发酵液用盐析的方法获得胞内蛋白提取物,然后通过制备型非变性凝胶电泳从中分离到对棉铃虫幼虫具有胃毒活性的蛋白复合物—毒素 II^[9],该毒素能够破坏棉铃虫中肠组织,并导致其生长发育缓慢^[10]。目前对该毒素的杀虫活性及对棉铃虫的中肠组织病理学影响进行了较为深入的研究,但是该类杀虫毒素对昆虫生理生化指标的影响还未见报道。笔者以从胞内蛋白提取物中分离得到的毒素 II 饲喂棉铃虫幼虫,观察棉铃虫幼虫的生长发育变化,并通过在测定其中肠蛋白酶、解毒酶和乙酰胆碱酯酶的活性,来揭示该毒素对棉铃虫几种生理生化指标的影响,以期更深入地了解毒素 II 的作用机理。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫与菌株

棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)和嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株(*X. nematophila* HB310)均由河北农业大学害虫生物防治实验室提供。

1.2 供试药剂

牛肉蛋白胨、牛肉膏、营养琼脂均为北京双旋微

生物培养基制品厂产品;考马斯亮蓝 G 250、甘氨酸、氨苯磺胺偶氮酪蛋白、 α -N-苯甲酰 DL-精氨酸 p-硝基苯胺(BAPNA)、p-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)、N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯(BTEE)、5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、二甲基亚砜、碘化硫代乙酰胆碱(ACh)、 α -乙酸萘酯、固牢蓝 BB 盐均为 Sigma 公司产品;N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)和毒扁豆碱为 Fluka 公司产品; α -萘酚、氯化钠等其它试剂均为国产分析纯。

1.3 毒素 II 分离纯化

共生菌胞内总蛋白的提取采用盐析法,毒素 II 的分离纯化采用制备型非变性凝胶电泳法,具体方法参见文献[8]。分离纯化的毒素 II 置于一70℃保存备用。

1.4 毒素 II 对棉铃虫生长发育的影响

挑选生长发育一致的棉铃虫 4 龄幼虫,预先饥饿 6 h,以毒素 II 为供试样品(蛋白浓度为 51.9 μ g/mL),以无菌水为对照。每处理按 100 μ L 样品 1 g 饲料的比例混合样品和饲料饲喂棉铃虫,置(27 \pm 1)℃、14 h 光照培养箱内,试验一直延续到试虫化蛹,每处理 100 头,记录棉铃虫的死亡和化蛹情况并统计其死亡率,称量化蛹第 2 天的蛹重。

1.5 毒素 II 对棉铃虫幼虫几种酶活性的影响

挑选生长发育一致的棉铃虫 4 龄幼虫,预先饥饿 6 h,以毒素 II 为供试样品(蛋白浓度为 51.9 μ g/mL),以无菌水为对照。每处理按 100 μ L 样品 1 g 饲料的比例混合样品和饲料,置(27 \pm 1)℃、14 h 光照培养箱内,饲毒后定期取样,每个样品取 10 头幼虫,设 3 个重复。

1.5.1 中肠蛋白酶活性测定 把上述处理的棉铃虫幼虫在 48 h 内按 6 h 的时间间隔取样,取得的幼虫在 0~4℃下迅速解剖,用预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液冲去体液,截取中肠及其内含物,冰冻贮存(−70℃)。测试前,取出稍融后,以 0.15 mol/L NaCl 溶液在玻璃匀浆器中冰浴条件下匀浆。匀浆液用 Eppendorf Centrifuge 5810R 离心机离心(12 000 r/min、4℃、15 min),取上清液作为测试用的酶液。

根据王琛柱等^[10]报道,蛋白酶活性在 30℃、最适 pH 值下,使用 UNICO UV 2602 紫外可见分光光度计测定。总蛋白酶活力用 pH 10.5 的甘氨酸缓冲液,以氨苯磺胺偶氮酪蛋白为底物测定。反应混合物在 12 000 r/min、4℃下离心 15 min 后,取上清液,测量 366 nm 下的光吸收值。类胰蛋白酶活力以 BAPNA 和 TAME 2 种专性底物测定,分别用 pH 10.5 的甘氨酸缓冲液和 pH 8.5 的 Tris 缓冲液,测量 406

和248 nm下反应混合物的光吸收变化值。类胰凝乳蛋白酶活力用pH 8.5的Tris缓冲液,以BTEE为专性反应底物,测定256 nm下光吸收的变化值。

1.5.2 解毒酶及乙酰胆碱酯酶活性的测定 把上述处理的棉铃虫幼虫在48 h内按6 h的时间间隔取样,将棉铃虫虫体在0~4℃下迅速解剖,弃除中肠及其内含物后,放入玻璃匀浆器中,加入0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0,含0.1% Triton X-100),冰浴条件下匀浆。匀浆液在4 000 r/min、4℃下离心10 min,取上清液作为待测酶液。

羧酸酯酶、酯酶的活性测定:参照Han等和赵颖等的方法^[11, 12](测定羧酸酯酶时,磷酸缓冲液中含10⁻⁴ mol/L毒扁豆碱)。

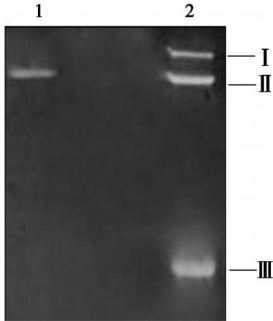
乙酰胆碱酯酶的活性测定:参照高希武的方法^[13],用磷酸缓冲液(pH 8.0),以ACh为底物,在25℃下反应15 min后,用DTNB显色,测量410 nm下光吸收的变化值。

1.5.3 数据分析 数据采用DPS数据处理系统进行方差分析和Duncan's新复极差多重比较^[14]。

2 结果与分析

2.1 毒素II分离纯化结果

从图1可以看出,盐析法得到的胞内蛋白,通过Native PAGE分离纯化的毒素II只有1个条带,其大小与原胞内蛋白条带一致(图1)。毒素II经SDS-PAGE检测分辨出3个条带(55~250 kDa)(图2),说明该蛋白为复合蛋白。



1. Toxin II; 2. Intracellular protein extract

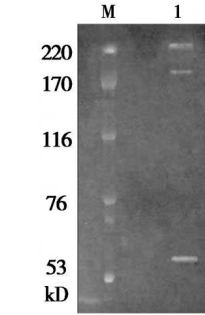
图1 胞内蛋白和毒素II Native-PAGE 图谱

Fig 1 Native-PAGE of Intracellular protein and toxin II

2.2 毒素II对棉铃虫4龄幼虫生长发育的影响

从表1可以看出,取食正常人工饲料的棉铃虫幼虫发育速度较快,4龄幼虫一化蛹的历期为4.65 d,而饲喂拌有毒素II人工饲料的棉铃虫幼虫发育速度缓慢,4龄幼虫一化蛹历期为6.65 d,与对照组的棉铃虫发育历期推迟2 d。毒素II对棉铃虫幼虫化蛹也具有显著的影响,毒素II饲喂的幼虫化蛹率为

62%,对照幼虫的化蛹率达到98%,并且处理组蛹的平均体重也明显低于对照,分别为(241.76±7.93)和(348.23±4.96)mg,两者差异显著。



M. 标准分子量; 1. 毒素II
M. Protein marker; 1. Toxin II

图2 毒素II蛋白的SDS-PAGE 图谱

Fig 2 SDS-PAGE spectrum of toxin II

表1 毒素II对棉铃虫4龄幼虫生长发育的影响

Tab 1 Effects of toxin II on the growth of *H. armigera* larvae in the 4th instar

供试样品 Samples	4龄幼虫一化蛹历期/d The larvae period(from 4th instar to pupae)	蛹平均体重/(mg/头) Average weight of pupae	化蛹率/% Pupation rate
对照 CK	4.65±0.02 b	348.23±4.96 a	98±1.33 a
毒素II Toxin II	6.65±0.01 a	241.76±7.93 b	62±2 b

注:表中数据为平均值 $\bar{X} \pm SE$,同一列数据中平均数后的字母不同表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著

Note: The data in the table indicate mean $\bar{X} \pm SE$, the means in the same column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$

2.3 毒素II对棉铃虫4龄幼虫中肠蛋白酶活性的影响

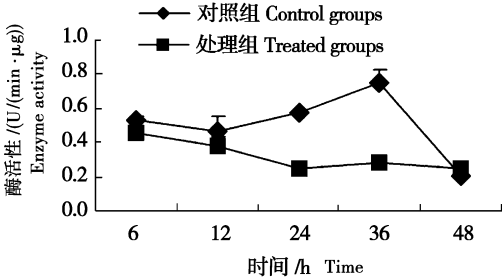


图3 棉铃虫幼虫在不同时段中肠内类胰蛋白酶活力(底物为TAME)的变化

Fig 3 Change of midgut trypsin like enzyme activity (TAME as substrate) of *H. armigera* larvae

由图3~6可以看出,饲毒后棉铃虫幼虫中肠几种蛋白酶活性的变化趋势基本上是一致的,在前期(12 h前)处理与对照各种蛋白酶活力差别不大,12 h以后饲毒幼虫的各种蛋白酶活性受到抑制,在饲喂毒素II后36 h,棉铃虫幼虫中肠弱碱性类胰蛋白酶、强碱性类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶和总蛋白酶活性与对照比较差异最大,均显著低于对照,分别为对照的0.370 8、0.190 3、0.328 2和0.214 1倍(表

2)。处理组的总蛋白酶、类胰蛋白酶(强碱性类胰蛋白酶、弱碱性类胰蛋白酶)的活性在6~48 h这段时间里变化趋势比较平缓,不同时间的酶活性差异不显著;对照幼虫中肠各种蛋白酶活性在6~48 h这段时间里变化均呈现低-高-低趋势,波动较大,不同时间的酶活性差异显著,在36 h后,对照幼虫这几种蛋白酶活性开始降低,到48 h已经降低到饲毒幼虫的蛋白酶活性水平。

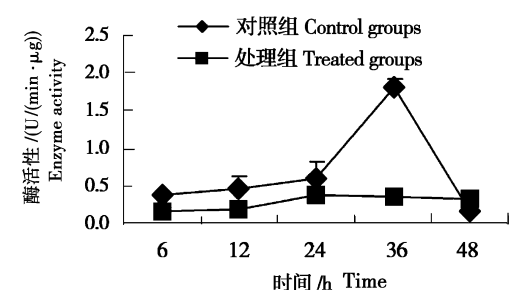


图4 棉铃虫幼虫在不同时段中肠类胰蛋白酶活力(底物为BAPNA)的变化

Fig 4 Change of midgut trypsin like enzyme activity (BAPNA as substrate) of *H. armigera* larvae

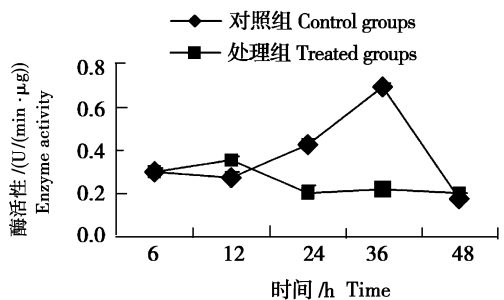


图5 棉铃虫幼虫在不同时段中肠内类胰凝乳蛋白酶活力(底物为BTEE)的变化

Fig 5 Change of midgut chymotrypsin like enzyme activity (BTEE as substrate) of *H. armigera* larvae

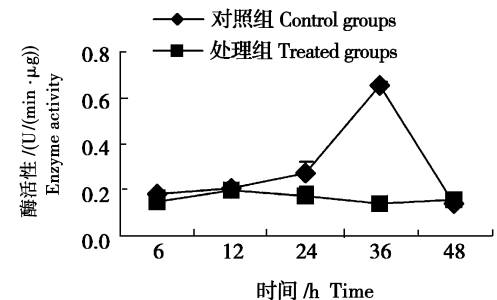


图6 棉铃虫幼虫在不同时段中肠内总蛋白酶活力(底物为偶氮酪蛋白)的变化

Fig 6 Change of midgut total protease activity of *H. armigera* larvae

2.4 对解毒酶和乙酰胆碱酯酶的影响

为了解毒素II对棉铃虫的防御酶和解毒酶的影响,分别测定了棉铃虫幼虫体内羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的活力。由图7,8可以看出,饲毒幼虫体内羧酸酯酶前期和乙酰胆碱酯酶变化趋势是一致的,

在前期(12 h前)这3种酶活均有所增加,到12 h处理与对照趋于一致,12 h后。由表3可以看出,在饲喂毒素II后36 h,棉铃虫幼虫羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的活力分别达到(34.76±2.31), (27.80±3.70)和(27.62±1.11),均显著高于对照,分别为对照的15.66, 9.49, 6.38倍。这说明饲喂毒素II 36 h时,棉铃虫幼虫体内诱导了解羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的活性。

表2 毒素II对棉铃虫幼虫中肠蛋白酶的影响

Tab 2 Effects of toxin II on the midgut protease activity of <i>H. armigera</i> larvae			
中肠蛋白酶 Midgut protease	中肠蛋白酶活性 Activity of midgut protease		
	对照 CK	毒素II Toxin II	比值 Ratio
弱碱性类胰蛋白酶 Weak alkaline trypsin like enzyme	0.754 3±0.052 9	0.279 7±0.019 3 *	0.370 8
强碱性类胰蛋白酶 Active alkaline trypsin like enzyme	1.820 2±0.067 9	0.346 3±0.011 4 *	0.190 3
类胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin like enzyme	0.689 3±0.014 7	0.226 2±0.016 7 *	0.328 2
总蛋白酶 Total protease	0.658 1±0.002	0.140 9±0.010 3 *	0.214 1

注:蛋白酶的活力单位为U/(min·μg);表中数据为 $\bar{x} \pm SE$; *表示与对照在P<0.05水平差异显著

Note: The activity of midgut protease are measured by U/(min·μg); the data in the table indicate mean $\bar{x} \pm SE$; * indicates significance compared to the control at P<0.05

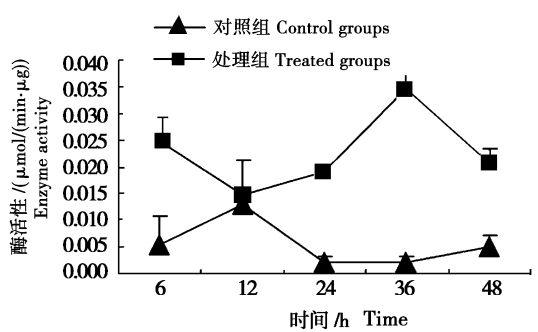


图7 棉铃虫幼虫在不同时段羧酸酯酶活力(底物为α-NA)的变化

Fig 7 Change of carboxylesterase activity(α-NA as substrate) of *H. armigera* larvae

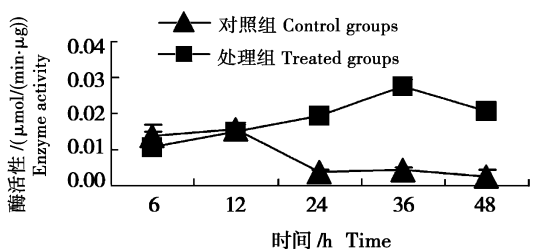


图8 棉铃虫幼虫在不同时段乙酰胆碱酯酶活力(底物为ACh)的变化

Fig 8 Change of acetylcholinesterase activity(ACh as substrate) of *H. armigera* larvae

表 3 毒素 II 对棉铃虫 4 龄幼虫解毒酶和乙酰胆碱酯酶活力的影响

酶的类型 Enzymes	酶活力 Enzyme activities		
	对照 CK	毒素 II Toxin II	比值 Ratio
羧酸酯酶/($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{ng})$) Carboxylesterase	2.22 \pm 0.67	34.76 \pm 2.31 *	15.66
乙酰胆碱酯酶/($\text{U}/(\text{min}\cdot\mu\text{g})$) Acetylcholinesterase	4.33 \pm 0.33	27.62 \pm 1.11 *	6.38

3 结论与讨论

已有研究发现,毒素 II 具有一定的拒食作用,对棉铃虫初孵幼虫和 4 龄幼虫具有明显的生长抑制作用^[10]。本试验结果表明,取食毒素 II 后棉铃虫幼虫取食量减少,发育速度减慢,处理组 4 龄幼虫至化蛹历期比对照明显推迟,此外毒素 II 对棉铃虫幼虫的化蛹也有显著的影响,部分老熟幼虫不能正常化蛹,毒素 II 饲喂的幼虫化蛹率仅为 62%,并且其蛹平均体重明显低于对照蛹重。毒素 II 是否会影响棉铃虫下一代的种群数量还有待进一步测定。

中肠是昆虫消化和吸收食物的场所,昆虫中肠蛋白酶是中肠上皮细胞分泌的消化蛋白质和碳水化合物的重要酶,类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶为代表的丝氨酸蛋白酶是昆虫中肠的主要蛋白酶。来自嗜线虫致病杆菌的毒素 II 对中肠蛋白酶有明显的抑制作用,与常规的胃毒剂抑制消化酶系活力特性类似,但与同为蛋白毒素的苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素对棉铃虫中肠蛋白酶活性的影响有所差异。棉铃虫幼虫在取食 Bt 毒蛋白后类胰凝乳蛋白酶活力显著升高,这是因为中肠内的类胰蛋白酶在 Bt 前毒素活化为 Bt 毒素的过程中起着主要作用^[15-17],棉铃虫幼虫体内类胰凝乳蛋白酶活力的升高有利于其对体内产生的 Bt 毒素进行降解。而本研究发现在棉铃虫幼虫取食毒素 II 36 h 时,类胰凝乳蛋白酶活性受到显著抑制,说明毒素 II 不需要中肠酶的酶解活化就能直接发挥作用,受昆虫中肠内的环境影响较小,这可能也是导致嗜线虫致病杆菌的杀虫谱比 Bt 广的原因^[8]。

本试验发现,对照棉铃虫幼虫体内酶活性不是固定不变的,特别是中肠蛋白酶不同时间段差异非常显著。李伟等^[19]测定了棉铃虫幼虫 4 龄期内取食及消化的变化及与中肠蛋白酶的关系,结果显示 4 龄期内取食及消化的变化是一致的,中肠主要蛋白酶活性和取食量均随幼虫发育前一中一后期呈现低—高一低的变化趋势。本试验所用试虫是蜕皮后饥饿 6 h 的 4 龄幼虫,取样时间正好涵盖了同一龄

期内的前一中一后 3 个时期,因而对照幼虫中肠几种蛋白酶活性的变化规律与李伟等的结果是类似的,而饲毒幼虫因为中肠蛋白酶受到抑制其活性一直比较低。因此在测定酶活的试验中,如果仅取个别时间段的数据为对照并与每一个时间段的处理数据比较,试验结果误差会较大。此外本试验结果中,出现了处理 48 h 时对照与处理酶幼虫中肠蛋白酶活性之间的差异缩小的现象,与对照试虫 4 龄期内中肠酶活的变化有很大关系,此外与饲毒幼虫的发育速度慢可能也有一定的关系。

羧酸酯酶是害虫体内重要的解毒酶系,在对外源化合物的解毒代谢和杀虫剂抗性机制中起着重要作用。乙酰胆碱酯酶作为清除神经突触部位的乙酰胆碱、维护神经正常传导的重要酶类,被认为是有机磷和氨基甲酸酯等杀虫剂作用的靶标。本研究结果显示毒素 II 能诱导棉铃虫幼虫体内羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的活性,从 24 h 开始饲毒幼虫羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶活力均显著高于对照。南宮自艳等^[9]研究报道饲喂棉铃虫幼虫同样剂量的毒素 II 后,24 h 开始中肠细胞受到严重破坏,由此推测毒素 II 在 24 h 可能已经穿过中肠组织进入到了棉铃虫体腔内,因而诱导了体内羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的活性,并导致幼虫对毒素 II 抵抗能力的升高,这也许可以解释毒素 II 虽然对棉铃虫幼虫的生长发育有显著的影响,但是对棉铃虫的致死毒力较低的现象^[9]。确切的机理还有待深入探讨。

参考文献:

[1] 邱立红,张文吉,李晓薇.棉铃虫微粒体多功能氧化酶系组分含量及酶活性在不同生长发育阶段的变化规律研究[J].农药学报,1999,1(1):45-50.

[2] 沈晋良,周威君,吴益东,等.棉铃虫对生物农药早期抗性及其与转基因棉抗虫性的关系[J].昆虫学报,1998,41(1):8-14.

[3] 吴家和,陈志贤,李淑君,等.转 Bt 基因棉花各组织器官对棉铃虫抗性的研究[J].华北农学报,1999,14(2):1-5.

[4] Sicard M, Brugirard-Ricaud K, Pagès S, et al. Stages of Infection during the Tripartite Interaction between *Xenorhabdus nematophila*, Its Nematode Vector, and Insect Hosts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 6473-6480.

[5] Bowen D, Rocheleau Thomas A, Blackburn M, et al. Insecticidal toxins from the bacterium *Photobacterium luminescens* [J]. Science, 1998, 280: 2129-2132.

[6] Bowen D J, Ensign J C. Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced

- by the entomopathogenic bacterium *photorhabdus luminescen*
[J] . Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 3029
— 3035.
- [7] 李秀花, 王勤英, 陆秀君, 等. 不同昆虫寄主对昆虫病原
线虫共生菌的敏感性比较[J] . 昆虫知识, 2004, 41(1):
39— 42.
- [8] 王勤英, 南宫自艳, 陆秀君, 等. 嗜线虫致病杆菌 HB310
菌株杀虫蛋白的纯化及活性鉴定[J] . 昆虫学报, 2005,
48(3): 353— 358.
- [9] 南宫自艳, 王勤英, 宋 萍, 等. 嗜线虫致病杆菌杀虫毒
素对棉铃虫的中肠组织病理学研究[J] . 中国农业科
学, 2005, 38(11): 2240— 2245.
- [10] 王琛柱, 钦俊德. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的
鉴定[J] . 昆虫学报, 1996, 39(1): 7— 13.
- [11] 赵 颖, 高希武, 胡熯华, 等. 棉蚜不同抗性品系羧酸
酯酶比较[J] . 植物保护学报, 1997, 24(4): 351— 355.
- [12] Han Z J, Moores G D, Denholm I, *et al.* Association be-
tween biochemical markers and insecticide in the cotton
aphid *Aphis gossypii* Glover[J] . Pesticide Biochemistry
Physiology, 1998, 62: 164— 171.
- [13] 高希武, Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方
法介绍[J] . 昆虫知识, 1987, 24(4): 245— 246.
- [14] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系
统[M] . 北京: 科学出版社, 2002: 1— 664.
- [15] Mohan M, Gujar G T. Characterization and comparison of
midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and re-
sistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera) [J] . J
Inverteb Pathol, 2003, 82 : 1— 11.
- [16] 李 伟, 王琛柱. 棉铃虫 4 龄幼虫的摄食行为和中肠
蛋白酶活性的变化[J] . 昆虫学报, 1999, 42(4): 358—
363.
- [17] 朱九生, 乔雄梧, 王 静, 等. 10 种中草药对 4 种主要
害虫的生物活性研究[J] . 华北农学报, 2004, 19(2): 95
— 99.