

文章编号:1001-1498(2004)02-0154-05

刺槐种子凝集素对舞毒蛾幼虫营养代谢影响的初步研究^{*}

刘红霞¹, 严东辉², 张星耀^{2*}, 梁军², 王臻¹

(1. 北京林业大学森林资源与环境学院,北京 100083;

2. 中国林业科学研究院森林生态与环境保护研究所,北京 100091)

摘要:在室内饲养舞毒蛾的条件下,用刺槐种子凝集素处理的叶片喂食舞毒蛾幼虫,对幼虫取食叶片后的死亡率、消化率、转化率和利用率进行了研究,结果表明:与对照相比,取食处理叶片的幼虫,有较高的死亡率,达 59%;刺槐种子凝集素对舞毒蛾幼虫的营养代谢有较强的抑制作用。

关键词:刺槐;种子凝集素;舞毒蛾

中图分类号:S792.27 S763 **文献标识码:**A

植物凝集素是一类含有 1 个或多个可与单糖或寡聚糖特异可逆结合的非催化结构域的植物蛋白,它们的分子结构、糖结合特异性和生物活性各不相同。早期的凝集素大部分是从豆科(Leguminosae)植物中提取的^[1]。随着对凝集素研究的增多,发现植物的根、茎、叶、种子中都有凝集素的存在,而且一种植物可有多种凝集素^[2]。目前已经从植物的种子、根、茎、叶、皮甚至果实汁液中找到近千种凝集素^[3,4]。由于植物凝集素广泛存在于植物中不同的组织器官及各发育阶段,同时各有特定的糖结合专一性,因此,凝集素在植物中的生理功能被认为是多种多样的。现在对凝集素比较一致的看法是凝集素的糖结合活性及其专一性决定了它们的功能。许多研究表明,凝集素在植物的防御反应中扮演着重要的角色,它们是参与抵抗植物病原和捕食者的防御机制的重要组成部分,而决定它们抗性的就是它们的糖结合活性,它们可以识别并结合入侵者上的糖结构。人工饲养实验表明,许多植物凝集素对昆虫具有毒性,如对雪莲花凝集素(galanthus nivalis agglutinin, GNA)的研究表明,它对稻褐飞虱(*Nilaparvata lugens* (Stal))、蚜虫(*Myzus persicae* (Sulzer))等同翅目(Homoptera)的害虫及线虫均有很好的毒杀效果,对咀嚼式口器的害虫也有中等毒杀作用^[5]。如以生物素化的 WGA(wheat germ agglutinin 麦胚凝集素)、羊蹄甲凝集素 BPA(Bauhinia purpurea agglutinin)等为探针印迹检测发现,WGA、BPA 强烈结合到围食膜提取出的 22 KD 蛋白上,此蛋白可能是形成围食膜的主要成分。推测对此蛋白的结合是 WGA、BPA 对玉米螟(*Ostrinia furnacalis* (Guenee))幼虫抗虫性原因所在。此外还发现导致玉

收稿日期:2003-11-18

基金项目:国家重点发展规划(973)林木育种的分子基础(G19990160)

作者简介:刘红霞(1968—),女,山西五台人,副教授,在职博士生。

* 幼虫饲养实验由北京林业大学研究生石娟协助完成,特此致谢。

* * 通讯作者:xyzhang@forestry.ac.cn

米螟显著死亡的凝集素也能强烈结合到纹缘膜上。现在一般认为植物凝集素被昆虫摄入体内后,它就从植物细胞的蛋白粒中释放出来,可与昆虫肠道围膜上的糖蛋白相结合,降低了膜的通透性,影响营养物质的正常吸收;外源多糖可能是许多植物凝集素最可能的受体,外源多糖包括真菌或植物病毒表面、昆虫或草食动物肠道表面的糖蛋白。虽然目前植物凝集素对昆虫及动物产生毒害的机理还不是很清楚,但一般认为植物凝集素可能通过昆虫围食膜表面、消化道上皮的糖缀合物或糖基化的消化酶等结合影响昆虫的消化及营养的吸收,促进消化道中细菌的繁殖和诱发病灶,抑制昆虫的生长发育和繁殖,最终达到杀虫效果^[6]。目前,已成功地将豌豆(*Lathyrus* sp.)外源凝集素基因转化到烟草(*Nicotiana tabacum* L.),抗虫效果明显。但目前植物凝集素的大部分工作主要集中于对蚜虫、稻飞虱类农作物害虫的控制方面^[11,12],对于一些重要的林木害虫的研究报道极少。这也是本研究的目的和意义所在。

刺槐(*Robinia pseudoacacia* Linn.)种子凝集素属于豆科凝集素家族,关于豆科植物凝集素的研究报道较多^[13,14],但将其应用于林木病虫害的研究未见报道。希望通过本研究增加林木病虫害控制的新途径,并为今后的抗病虫树种基因工程的研究工作打下一定的基础。

刺槐是重要的绿化树种,在我国大部分地区栽植。刺槐的树皮和种子均含有凝集素,国内外尚无关于刺槐凝集素在林木病虫害控制方面的研究和报道。舞毒蛾(*Lymantria dispar* L.)属鳞翅目(Lepidoptera)毒蛾科(Lymantriidae),是一种世界性的害虫。它具有宽的生境幅度和强的生态可塑性,而且舞毒蛾幼虫食性较杂,取食范围广,据报道,其寄主植物超过了 500 种^[7,8]。本研究以刺槐种子为植物凝集素的来源,以舞毒蛾为研究对象,初步探讨刺槐种子凝集素对舞毒蛾幼虫生长发育的影响,并在此基础上作进一步的深入研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

刺槐种子购自中国林木种子公 司;供试昆虫舞毒蛾来源于北京西山林场室内人工饲料饲养的 4 龄幼虫,其虫卵采自内蒙古大兴安岭的兴安落叶松(*Larix gmelini* (Rupr.) Rupr.)林内;实验用兔血购自中国农业大学兔场;喂食舞毒蛾的叶片为桑树(*Morus alba* L.)叶,采自北京林业大学校园。

1.2 刺槐种子凝集素的分离纯化与活性测定

1.2.1 刺槐种子凝集素的分离 将 100 g 种子浸泡在 0.86 %NaCl 中 2~3 h,研磨,匀浆,用四倍体积的生理盐水(pH 值为 7)在 4 ℃提取过夜,中等程度不断的搅拌。在 4 ℃ 9 000 g 离心 30 min,收集上清液。调 pH 值为 6.5,离心弃沉淀,用 20%~80%饱和度的硫酸铵对上清液进行分级沉淀,离心收集沉淀,并测定其凝血活性。将沉淀溶解在少量的 PBS(pH 值 7.2)缓冲液中(约 30~50 mL),之后在 4 ℃对生理盐水透析 2~3 d(透析袋的分子截流量为 12 000~14 000 MWCO),透析过程中不断的搅拌,1 d 更换 3 次透析缓冲液。离心去掉透析后的沉淀并测其凝血活性。

1.2.2 凝集素蛋白的纯化 取 Sepharose-4B 装柱(2.6 cm ×40 cm),用 PBS 液平衡,将凝集素粗品上柱,用相同缓冲液洗柱,流速为 30 mL · h⁻¹,6 mL⁻¹ · 管⁻¹,分部收集,测各部分在 A280 nm 的吸收值,收集有凝血活性的部分。将其冷冻干燥后过 Sephadex G150 柱(1.6 cm ×100 cm),用 PBS 洗脱,分部收集,流速 15 mL · h⁻¹,3 mL⁻¹ · 管⁻¹,对各部分进行紫外检测,并测凝血活

性,收集有凝血活性的部分,进行冷冻干燥,干燥后的提取物保存在 -20°C 备用。

1.2.3 凝血活性测定^[9] 采用96孔“V”型血凝板进行。每孔加入25 μL 缓冲液,取凝集素样品25 μL 加入第1孔,混匀后加入第2孔,依次作倍比稀释,再加入25 μL 2%的兔红细胞悬液,在微型振荡器上震动1 min之后放置1.5~2.0 h,观察凝集结果。

1.3 舞毒蛾的人工饲养方法

将舞毒蛾4龄幼虫放在直径4 cm,高10.7 cm的指形管中饲养,瓶口用双层纱布和橡皮筋扎紧。所用的指形管使用之前在 105°C 高温下消毒2 h,每管5头幼虫,饲养温度 27°C 左右,待第3日舞毒蛾将人工饲料排出后,将其进行喂食处理。处理设10个重复,2个对照。

1.4 叶片的处理方法

将纯化后的凝集素蛋白溶解在无菌水中,配成2%的溶液。将新鲜叶片洗净,再用无菌水冲洗之后,将其剪成面积大小相近的小叶片,4片下浸泡在凝集素溶液中5 h或过夜,将处理后的叶片放入指形管中喂食幼虫。对照用无菌水浸泡叶片后喂食幼虫。

1.5 舞毒蛾取食凝集素后的营养效应的测定

在用叶片喂食舞毒蛾之前先称虫质量,食物质量,统计每日死亡率,隔日统计喂食后虫质量,残食量和虫粪质量,叶片干质量,残留叶片干质量,虫粪干质量。用Waldbauer公式^[10]分别计算第3日和第5日的消化率(AD),食物利用率(EI)和食物转化率(ECD)。

消化率(AD) = (取食量 - 排粪量) / 取食量;转化率(ECD) = 体质量 / (取食量 - 排粪量);利用率(EI) = 体质量 / 取食量

分别统计第3日及第5日上述内容,进行计算和分析。

2 结果与分析

2.1 刺槐种子凝集素的分离与纯化

从刺槐种子的凝集素粗提液到纯化后的蛋白均有很好的凝血活性。用Sapharose-4B洗脱后得到3个蛋白峰,其中2个大的蛋白峰有较强凝血活性,收集之后过Sephadex G-150柱层析,得到两个活性峰(图1),均有凝血活性。冷冻干燥后用于舞毒蛾喂食实验。

2.2 4龄舞毒蛾幼虫对食物的利用和转化

喂食处理后,舞毒蛾的每日平均死亡率如图2所示。

处理叶片喂食幼虫后,幼虫的平均死亡率为59%(为第3日与第5日死亡率的加权平均值),对照的死亡率为7.8%。说明舞毒蛾取食经刺槐种子凝集素处理后的叶片,对其生长产生了较大影响。用处理叶片喂食之后的第5日

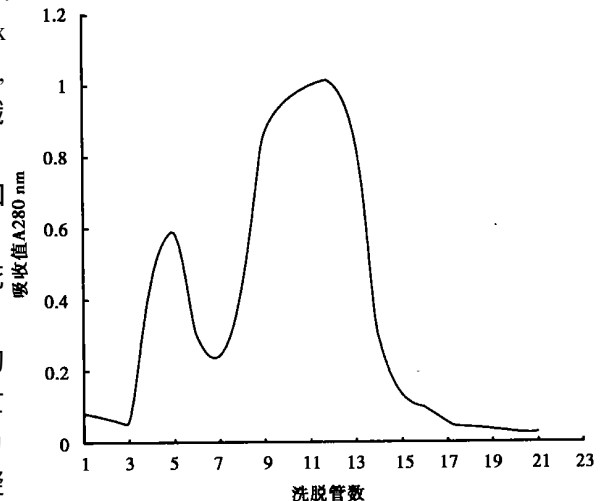


图1 刺槐种子凝集素在Sephadex G-150柱上的层析

幼虫的死亡率较高,存活的幼虫大部分已经不取食叶片,由此可以说明,刺槐种子凝集素处理后的叶片对舞毒蛾幼虫的营养代谢有一定的抑制作用,也是导致舞毒蛾幼虫死亡的主要原因。

对食物的利用和转化进行方差假设为 0 的 t 检验(据第 3 日数据进行的分析)。

$$\text{消化率} = (\text{取食量} - \text{排粪量}) / \text{取食量}$$

$$x \text{ 的平均值} = 0.672\ 647\ 325 \text{ (处理平均值)}$$

$$n = 10 \quad u_0 = 0.896\ 03 \text{ (对照平均值)}$$

$$s = 0.083\ 161$$

$$t = (0.672\ 647\ 325 - 0.896\ 03) \cdot 3 / 0.083\ 161 = -8.058\ 441 > t_{0.05}(9) = 2.262 > t_{0.01}(9)$$

$$= 3.25$$

0.01 水平上差异显著。

$$\text{转化率 (ECD)} = \text{体质量} / (\text{取食量} - \text{排粪量})$$

$$x \text{ 的平均值} = 0.554\ 166\ 751 \quad n = 10 \quad u_0 = 0.119\ 44$$

$$s = 0.450\ 151\ 471$$

$$t = (0.554\ 166\ 751 - 0.119\ 44) \cdot 3 / 0.450\ 151\ 471 = 2.897\ 203\ 135 > t_{0.05}(9) = 2.262 < t_{0.01}(9)$$

$$= 3.25$$

0.05 水平上差异显著。

$$\text{利用率 (ECI)} = \text{体质量} / \text{取食量}$$

$$x \text{ 的平均值} = 0.346\ 238\ 83 \quad n = 10 \quad u_0 = 0.107\ 048$$

$$s = 0.206\ 142\ 247$$

$$t = (0.346\ 238\ 83 - 0.107\ 048) \cdot 3 / 0.206\ 142\ 247 = 3.480\ 957\ 933 > t_{0.05}(9) = 2.262 > t_{0.01}(9)$$

$$= 3.25$$

0.01 水平上差异显著。分析结果表明,处理与对照在消化率、利用率和转化率上均有差异,刺槐种子凝集素对舞毒蛾幼虫的营养代谢有一定的影响。

比较第 3 日与第 5 日舞毒蛾幼虫对其所摄取营养的利用及转化(图 3),可以得出,虽然两日的平均虫质量起伏不大,但第 5 日绝大部分幼虫已基本上停止取食,幼虫已经失去了对所取食养料的转化和利用能力。实验结果说明刺槐种子凝集素对舞毒蛾的营养代谢及生长发育有抑制作用。

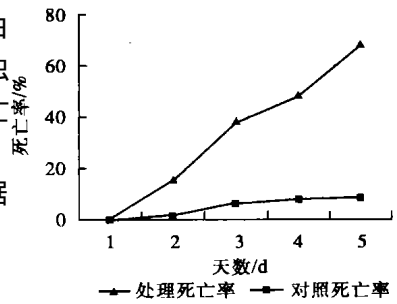


图 2 舞毒蛾死亡率

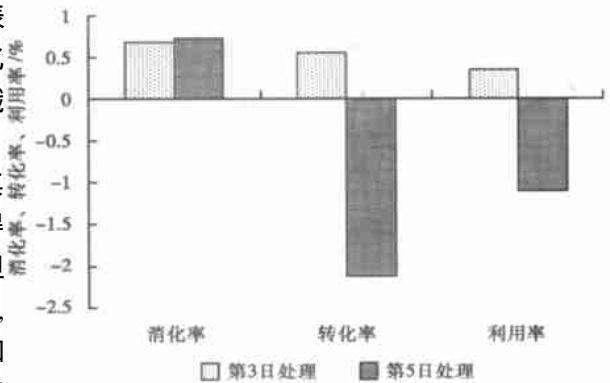


图 3 第 3 日和第 5 日处理舞毒蛾营养利用比较

3 结论

本研究用了2%的刺槐种子凝集素浓度处理叶片,从实验结果可以说明,与对照相比,用处理后的叶片喂食舞毒蛾,舞毒蛾的死亡率增加、对营养的利用率、转换率和消化率均有明显的下降。说明刺槐种子凝集素对舞毒蛾的生长及其营养代谢有明显的抑制作用。

本实验研究中用了2%的凝集素浓度,不同凝集素浓度对舞毒蛾生长及代谢的影响正在研究中。

参考文献:

- [1] 孙册.凝集素的研究进展[J].生物化学与生物物理进展,1981(3):15
- [2] Van Damme EJ M, Barre A, Rouge P, et al. The seed lectins of black locust (*Robinia pseudoacacia*) are encoded by two genes which differ from the bark lectin genes[J]. Plant Mol Biol, 1995b, 29:1197~1210
- [3] 范金水,罗志良,戴开甲.棉铃虫血淋巴凝集素的性质研究[J].武汉大学学报(自然科学版),1997,43(6):781~784
- [4] 林晓红,余萍,林少琴,等.甘薯品种岩凝集素的分离纯化及其性[J].福建师范大学学报(自然科学版),2000,16(4):59~62
- [5] 孙小芬,唐克轩,万丙良,等.表达雪莲凝集素(GNA)的转基因水稻纯系抗褐飞虱[J].科学通报,2001,46(13):1108~1113
- [6] 王志斌,李学勇,郭三堆.植物凝集素与抗虫基因工程[J].生物技术通报,1998(2):5~7
- [7] 岳书奎,宁长林.舞毒蛾生命表的初步研究[M].林业科技通讯,1989(10):6~10
- [8] 肖刚柔.中国森林昆虫(第2版)[M].北京:中国林业出版社,1992.1086~1087
- [9] 孙册,朱政,莫汉庆.凝集素[M].北京:北京大学出版社,1986
- [10] A·伊里因斯基.森林食叶害虫的观察及其大量发生的预测[M].殷殿忠译.北京:中国林业出版社,1957
- [11] 周永刚,田颖川,莽克强.苜蓿凝集素基因的克隆及在转基因烟草中的抗蚜性研究[J].生物工程学报,2001,17:34~39
- [12] 毛雪,高丽峰,李彩霞,等.植物凝集素对蚜虫的抗生效应[J].山西农业大学学报,1999,19(2):122~125
- [13] Peumans WJ, Van Damme EJ M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1998(15):199~228
- [14] 孙建忠,王克夷.植物凝集素超级家族[J].生物化学与生物物理进展,1994,21:104~109

A Preliminary Study on the Effects of Seed Lectins from *Robinia pseudoacacia* on Metabolism of *Lymantria dispar* Larvae

LIU Hong-xia¹, YAN Dong-hui², ZHANG Xing-yao², LIANG Jun², WANG Zhen¹

(1. College of Forest Resource and Environment, Beijing Forestry University, Beijing 100083;

2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: Insect feeding trials were conducted indoors to determine the effects of seed lectins from *Robinia pseudoacacia* on the utilization and transformation of *Lymantria dispar* after fed on soaking leaves with the seed lectins. The seed lectins showed significant antimetabolic effects towards fourth larvae of *Lymantria dispar* and the mortality of larval was high (59%).

Key words: *Robinia pseudoacacia*; seed lectin; *Lymantria dispar*