

文章编号: 1001-1498(2003)02-0233-07

昆虫病原真菌毒素的研究进展

李建庆¹, 张永安², 张星耀², 杨忠歧², 袁 锋¹

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 中国林业科学研究森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要: 根据昆虫病原真菌毒素的分子量和结构分为低分子量毒素和高分子蛋白毒素两大类, 根据结构将低分子量毒素分为环缩肽类、色素类、有机酸类和其它类, 根据功能将大分子蛋白毒素分为酶类毒素和非酶类蛋白毒素。对白僵菌素、破坏素等多种昆虫病原真菌毒素的结构和性质进行了阐述。从昆虫病原真菌产毒素的适宜培养条件到毒素的分离纯化方法、毒素毒力的生物测定和毒素的致病机理等方面的研究进展情况进行了评述。

关键词: 昆虫病原真菌; 毒素; 分离纯化; 白僵菌; 绿僵菌

中图分类号: Q939.5 Q965.8 **文献标识码:** A

昆虫病原真菌(entomopathogenic fungi)是一类重要的昆虫病原微生物,在生物防治上具有重要价值,白僵菌(*Beauveria* spp.)、绿僵菌(*Metarhizium* spp.)等昆虫病原真菌已成功地应用于防治松毛虫(*Dendrolimus* spp.)、亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis* (Guenee))、金龟子(*Holotrichia* spp.)等农林害虫。研究表明昆虫病原真菌分泌的毒素在致死寄主的过程中起关键作用^[1]。目前已发现了不少昆虫病原真菌毒素,但尚未开发出与毒素相关的商业制剂,故研究昆虫病原真菌毒素在生产上有重要的应用价值。本文拟对昆虫病原真菌毒素的结构性质、提取纯化、致病机理等方面国内外的研究进展情况予以总结,以期今后从事该方面研究的工作人员提供思路及借鉴。

1 昆虫病原真菌中可分泌毒素的主要类群

昆虫病原真菌指所有能够侵染或寄生活体昆虫(包括健康、衰弱或受伤的虫体)的真菌,有时也称虫生真菌(entomogenous fungi),严格地说,两者是有区别的,虫生真菌所指范围较昆虫病原真菌的范围要广一些,除昆虫外的其它节肢动物也适用于虫生真菌。昆虫病原真菌并非一分类单元,也不具备任何分类上的任何独特之处,而是不均匀地分布于真菌门的五个亚门中,其中多数种类属于子囊菌亚门(Ascomycotina)虫草属(*Cordyceps*)、接合菌亚门(Zygomycotina)虫霉目(Entomophthorales)及半知菌亚门(Deuteromycotina)丝孢纲(Hyphomycetes)^[2]。而其中已发现有毒素产生的类群主要为:白僵菌属(*Beauveria*)、绿僵菌属(*Metarhizium*)、野村菌属(*Nomuraea*)、曲霉属(*Aspergillus*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、轮枝孢属(*Ventricillium*)、虫草属(*Cordyceps*)、

收稿日期: 2002-03-18

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

作者简介: 李建庆(1977—),男,山东博兴人,硕士研究生。

虫霉属 (*Entomophthora*)、镰孢属 (*Fusarium*) 等。

2 昆虫病原真菌毒素结构与性质

1952年,Aoki和Shimodara^[1]报道,培养过白僵菌1个月的培养基对家蚕(*Bombyx mori* Linnaeus)幼虫有毒,首次证明昆虫病原真菌产生了有杀虫活性的代谢产物。Kodaira^[3]证明从被绿僵菌侵染的家蚕幼虫的血液中提取的物质注入健康家蚕体腔中能致死家蚕,从而表明确实有毒素存在。1961年Kodaira^[3]首次纯化出了破坏素(destruxin),在随后40多年的研究中已有几十种毒素被分离纯化。Mollier^[4]将这些毒素分为两大类:低分子量毒素(low-molecular-weight compounds)和高分子蛋白毒素(higher-molecular-weight protein molecules)。

2.1 低分子量毒素

2.1.1 环缩肽类 目前从昆虫病原真菌中分离出了多种环缩肽类毒素,并进行了较深入的研究。白僵菌素(beauverin)是从球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.)菌丝体内纯化出来的。该毒素是一环状三羧酸肽,分子量为783 Da,分子式为 $C_{45}H_{57}N_3O_9$,由3个相同的D-羟异戊基-L-N-苯基组成的环状化合物。该毒素为白色针状晶体,熔点93~94℃,耐热、较稳定,100

下1h仍保持毒性。该毒素可致细胞核变形、组织崩解^[5]。球孢交酯(bassianolide)是从球孢白僵菌和蜡蚧轮枝孢(*Verticillium lecanii* (Zimm.))侵染的家蚕幼虫中分离出来的。该毒素为一种环状四羧酸肽,分子量908 Da,分子式为 $C_{48}H_{84}O_{12}$,含有L-N甲基亮氨酸和D-羟基异戊酸。该毒素能引起五龄家蚕幼虫肌肉弛缓,最后死亡^[1,5]。破坏素(destruxin)是Kodaira^[3]从金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin.)的培养液中分离到的。当时从滤液中分离出6种环缩肽,其中两种杀虫活性高,分别命名为:destruxin A和destruxin B,两者结构类似,均由-丙氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和脯氨酸这5种氨基酸组成。破坏素对竹节虫(*Carausius* spp.)、大蜡螟(*Galleria mellonella* Linnaeus)等昆虫表现出毒性。用破坏素进行体腔注射后,不同昆虫表现的症状不同,多数鳞翅目(Lepidoptera)昆虫表现为强直性麻痹。破坏素对脊椎动物还有一定毒性,将其注入小鼠的腹膜内,可致小鼠立即惊厥然后死亡^[1]。此外,从白僵菌中分离出的白僵菌交酯(beauverolide)及棒束孢交酯(isarolide),也都是环缩肽类。

2.1.2 色素类 现已从球孢白僵菌和卵孢白僵菌(*B. tenella* (Delaer) Siem)中分出3种色素:一种是从培养液中分离出的红色色素——卵孢素(oosporein)^[6];另两种是从菌丝体内分离出的黄色色素——纤细素(tenellin)和球孢素(bassianin)^[7,8]。卵孢素是一联苯醌类化合物,其分子式为 $C_{14}O_8H_{10}$,分子量306 Da,具有一定抗生作用,可抑制虫尸中的细菌繁殖。Cole^[9]发现卵孢素对初孵1d的小鸡有口服毒性,对植物的生长有一定的抑制作用。Eyal^[10]经研究证实可产生卵孢素的白僵菌菌株NOV. EO-1与其它不产生卵孢素的菌株相比,该菌株对食叶害虫和地下害虫有更高的致病力。纤细素和球孢素分子结构也已清楚:纤细素为3-(4,6-二甲基-E,E-辛-2,4-二烯醇)-1,4-二羟基-5-(p-羟苯基)-2(1H)-吡哆酮;球孢素为3-(6,8-二甲基-E,E,E-癸-2,4,6-三烯酰基)-1,4-二羟基-5-(p-羟苯基)-2(1H)-吡哆酮^[1]。但对纤细素和球孢素的毒性研究较少,尚未见其对动物有毒性的报道。Jeffs^[11]对这三种色素进行了研究,发现这三种色素菌可破坏红细胞的细胞膜,抑制膜上ATP酶的活性,造成细胞功能失常。

2.1.3 有机酸类 多数真菌都可产生有机酸类代谢产物。Dresner^[12]在被卵孢白僵菌感染的昆虫表皮上发现有类草酸晶体(oxalic acid-like crystals),Cordon^[13]发现球孢白僵菌培养液中有

草酸产生,Bidochka^[14]在卵孢白僵菌的培养液中也发现了草酸。草酸可溶解昆虫体壁的构成成分——弹性蛋白(elastein)和类弹性蛋白(elastein-like),因而可破坏昆虫的体壁。有人认为草酸是白僵菌感染昆虫血淋巴的过程中产生的一种毒素。高剂量的草酸或草酸铵在 1~2 d 内可将家蝇(*Musca domestica* Linnaeus) 杀死^[11]。卵孢白僵菌培养液除草酸外,还有柠檬酸产生^[14]。Bidochka^[14]对这些有机酸进行了研究,发现它们在孢子萌发穿透昆虫体壁的过程中起重要作用,同时他还发现草酸和柠檬酸在致死寄主的过程中有明显的协同作用。

2.1.4 其它类毒素 莱氏野村菌素是从深层培养的莱氏野村菌(*Nomurea rileyi* (Farlow)) 菌丝体内提取出来的。该毒素含一吡啶环结构,对舞毒蛾(*Lymantria dispar* (Linnaeus)) 有注射毒性,对大蜡螟有触杀作用。从金龟子绿僵菌中分离出的细胞松弛素(cytochalasins)也是一种吡啶环结构毒素,细胞松弛素对哺乳动物有急性毒性,可抑制血细胞的运动,降低血细胞的吞噬能力。虫草菌素(cordycepin)是从蛹虫草(*Cordyceps militaris* (L.) Link) 的培养物中提取的一种毒素,有较弱的抗菌活性,能抑制病虫尸体上细菌的生长,其化学结构为 3-脱氧腺苷。从茄病镰孢(*Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc) 中分离出的镰红菌素(fusarubin)对红头丽蝇(*Calliphora vicina* Robinneaur-desvoidy) 成虫有注射毒性。此外,还有从黄曲霉(*Aspergillus flavus* Link) 中分离出的黄曲霉毒素(aflatoxin)和虫曲霉毒素(asperentin)^[11]。

2.2 高分子蛋白毒素

依其功能将其分为酶类毒素和非酶类蛋白毒素。

2.2.1 酶类毒素 昆虫病原真菌在侵入寄主体壁的过程中要分泌许多相关的酶类,主要是蛋白酶、几丁质酶及脂酶等。它们可降解体壁的组成成分——蛋白质、几丁质和脂类等物质,从而使孢子萌发的芽管得以穿透体壁^[15~17],因此这些酶对致死寄主有相当重要的辅助作用。胡锦涛^[18]和樊美珍^[19]研究发现,白僵菌的毒力与其分泌的胞外蛋白酶的量呈正相关关系。因此,许多研究人员对可降解昆虫体壁的胞外蛋白酶展开了广泛研究,已深入到了分子水平。目前已有几十种蛋白酶被纯化,有些蛋白酶的基因已被克隆。如裴炎^[20]从金龟子绿僵菌的培养液中分离出一种可降解昆虫体壁的蛋白酶 MAP-21,其 Mr 为 27 kD 左右,pI 为 7.6,特异识别精氨酸,是种类胰蛋白酶(trypsin-like protease,称 Pr2)。该酶最适反应温度为 50℃,最适作用 pH 值为 8.0。杨永勇^[21]从球孢白僵菌的培养液中分离出了一种凝乳弹性蛋白酶(chymelastase,称 Pr1)BbPr1。BbPr1 为单体酶,分子量 33.6 kD 左右,pI 为 7.4,能水解 Phe 或 Leu 形成的酰胺键和肽键,最适作用 pH 值为 8.5。Cole^[22]从金龟子绿僵菌培养液中分离到二种胰蛋白酶:其一属丝氨酸蛋白酶类(Serine protease class),分子量 28.8 kD,pI 为 5.4;其二属半胱氨酸蛋白酶类(Cysteine protease family),分子量 26.7 kD,pI 为 4.6。Urtz^[23]从卵孢白僵菌培养液中纯化出一种胰凝乳弹性蛋白酶,命名为 BBP-25,稳定,适宜 pH 值为 7.5~9.5。Kim^[24]从球孢白僵菌的液体培养基分离出了一种降解体壁的丝氨酸蛋白酶 bassiasin,其分子量约 32 kD,pI 为 9.5,最适 pH 值为 10.5,在 60~65℃ 时活性最高。Bassiasin 由 379 个氨基酸构成,全长 1 137 bp,其中含 3 个内含子,内含子长度分别 69、62、68 bp。编码 bassiasin 的基因转入大肠杆菌(*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers) 后可以表达并表现出降解蛋白活性。Borgo^[25]克隆了金龟子绿僵菌几丁质酶的编码基因 *chit1* 共 1 521 bp。

2.2.2 非酶类蛋白毒素 这类毒素本身可直接将寄主昆虫致死,但在这方面开展的研究工作不多。Mollier^[4]对白僵菌 *B. sulfurescens* 培养液通过层析获得一对甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*

Linnaeus) 细胞系有毒性的毒蛋白洗脱液,该毒蛋白不但抑制细胞的增殖,还可将细胞致死,其 $LC_{50} = 1.15 \pm 0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$,但奇怪的是该毒蛋白却对甘蓝夜蛾的幼虫毒性很弱,其 $LC_{50} = 150 \pm 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。后来 Mollier^[26]将该毒蛋白从 *B. sulfurescens* 的培养液纯化了出来,证明该毒蛋白为一种糖蛋白,其 N 端同寡甘露糖型糖链相连,分子量在 100~290 kD 之间。该蛋白对大蜡螟幼虫表现高毒性,其 LD_{50} 值不到 $10 \mu\text{g kg}^{-1}$,将其注入幼虫体内伴随有体壁黑化现象。

3 昆虫病原真菌产毒素的适宜培养条件

在不同培养基及不同环境条件下,昆虫病原真菌产生毒素的能力是有差别的。在蝉蜕诱导液、蝇蛆诱导液和 1/4 SDA 培养基中培养球孢白僵菌,均可产生胞外蛋白酶,但不同接种物诱导产生的胞外蛋白活性存在较大差异。在蝉蜕诱导液培养基中,芽管状物分泌总蛋白酶最活跃,而蝇蛆诱导液和 1/4 SDA 培养基分泌酶的量不及蝉蜕诱导液^[27]。同时蝉蜕诱导液中芽管状物产生类枯草杆菌蛋白酶(Pr1)的水平也最高。他们的研究可以看出,培养基中加入诱导物蝉蜕可使球孢白僵菌类枯草杆菌蛋白酶(一种可降解体壁的高分子毒素)的产量增加。

Sharma^[28]研究了温度、光照、辐射及 pH 值对球孢白僵菌毒素产量的影响,结果表明:25 时毒素产量最高,其次是 30 ,若温度超过 35 时白僵菌停止生长;在微酸性条件下,pH 值为 6.5 时,毒素产量最高;在 12 h 光照和 12 h 黑暗交替的光周期条件下,毒素产量最高;电灯光照射的条件下比柔和光照射的条件下毒素产量高;4 h 紫外照射和 20 h 黑暗条件下毒素产量也较高,可能是紫外照射诱发突变所致。从以上研究中不难看出,要获得最大的毒素产量,其所需微环境的温度宜为 27 ± 2 ,光周期宜为 12 h 黑暗和 12 h 光照,pH 值宜为微酸性 6.5 左右,最好再在培养基中加入某种特定诱导物,如蝉蜕和虫尸粉等。

4 昆虫病原真菌毒素的提取纯化

目前毒素分离的常用方法主要有吸附法、沉淀法、萃取法及柱层析等方法。不同毒素的化学性质不同,其分离方法也不一样。

4.1 破坏素的提纯

吸附法提纯破坏素的方法^[1]:将绿僵菌培养液的滤液用 0.7% 活性炭吸附,再用丁醇-水(1:1, V/V)将活性物质从活性炭上洗脱下来,然后分离黄色相,真空喷雾浓缩,用苯充分萃提。苯液过中性氧化铝柱子,然后分别用含 5% 和 10% 乙醇的苯洗脱,分开收集,便可得到破坏素 A(简称 DA)和破坏素 B(简称 DB),苯油经重结晶即可得无色的 DA 和 DB 的晶体。

李农昌^[29]以金龟子绿僵菌小孢变种(*Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin var. *anisopliae* Tulloch) 为材料,将其菌丝体捣碎,过滤浓缩后得黄色粘稠状粗提物,然后对粗提物进行薄层层析,最终也纯化到了破坏素。

4.2 白僵菌毒素的提纯

吸附法提取白僵菌毒素,参照武艺的方法^[30]:将白僵菌培养液的滤液 pH 值调至 2.0,加入 0.5% 活性炭吸附,抽滤取滤液,再调至 pH 值 8.0,按 40 g L^{-1} 加入活性炭吸附毒素,过滤弃滤液,将活性炭装柱后用甲醇(HCl 调至 pH 值 2.0)洗脱 3 次,将洗脱液调至 pH 值 4.5,蒸发甲醇得浓缩粘稠物,进一步用丙酮沉淀,甲醇溶解,最后用乙醚沉淀,真空干燥后获得毒素。

4.3 高分子蛋白毒素的分离

这类毒素的分离多为柱层析和电泳相结合来完成。

杨星勇分离球孢白僵菌凝乳弹性蛋白酶 BbPr1 的方法:将发酵液离心取上清液,对上清液进行超滤浓缩,获得粗提液,然后将粗提液上 Ultrogel AcA 54 柱进行凝胶过滤层析,用 0.02 mol L^{-1} (pH 值 8.5) Tris-HCl 缓冲液洗脱,所得洗脱液的活性部分再上 Express Ion Q 柱,进行离子交换层析,收集洗脱液活性部分;然后将该活性部分进行等电聚焦电泳,从胶板上切下所需胶条,进行电洗脱,最终获得 BbPr1。Urtz 从白僵菌分离胞外蛋白酶 BBP 的方法^[23]:发酵液的滤液(经 $0.45 \mu\text{m}$ 过滤灭菌)经超滤浓缩后上 CM Sepharose CL-6B 柱,进行离子交换层析,收集活性部分进行等电聚焦制备电泳,电洗脱出目的蛋白酶,再上 Sephadex G-75 柱进行凝胶过滤层析,便可收集到 BBP。

Mollier 纯化对大蜡螟高毒性的糖蛋白的方法^[26]:真菌培养液 $15\,000 \text{ g}$ 离心 15 min ,收集上清液,再先后用 Whatman 2 号滤纸, 1.2 、 0.6 、 $0.22 \mu\text{m}$ 的 Millipore 滤器过滤,所得滤液用截留分子量为 $100\,000 \text{ Da}$ 的超滤膜进行超滤浓缩;浓缩过滤除菌后,上 DEAE 葡聚糖纤维素柱进行离子交换层析,用 $0.0 \sim 0.5 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl 梯度液进行洗脱,收集有毒性部分;收集到的有毒性部分,加入 1 mmol L^{-1} M CaCl_2 后上 Con A-Ultrogel 柱进行亲和层析,二价阳离子(如 Ca^{2+})存在时目的蛋白可与 Con A(伴刀豆球蛋白)结合而留在柱上,然后用甲基-D-吡喃甘露糖苷逐步洗脱下来,而非糖蛋白则不与 Con A 结合,用平衡缓冲液冲洗掉。

5 昆虫病原真菌毒素的生物测定

毒素纯化出来之后要通过生物测定对其毒性进行检测,通常有 3 种途径:口服,表皮接触,血腔注射。血腔注射的方法一般为,挑选出健康且虫龄一致的试虫,用少量乙醚麻醉,从其身体易愈合部位(多为腹足处)注入毒素液,一般为 $10 \sim 20 \mu\text{L}$,每天观察记录死亡情况。将毒素混于食料,让试虫取食就会发生口服或表皮接触。将试虫麻醉,取毒素液 $4 \sim 5 \mu\text{L}$ 滴于试虫口上,试虫复苏时便把毒素吸入口腔,完成口服。用喷雾法也可完成表皮接触,莱氏野村菌素对大蜡螟喷雾处理表现出毒性^[1]。

此外,还可用昆虫的体外培养细胞进行毒力测定,其方法^[31]为,在细胞培养瓶中加入毒素溶解液,用苔盘蓝进行染色,在光学显微镜下镜检,死细胞被染成蓝色,而活细胞不着色。

6 昆虫病原真菌毒素的致病机理

昆虫病原真菌毒素种类繁多,其作用方式也多种多样,如阻碍核酸生成(虫草菌素),使核交变(球孢交酯),降低血淋巴中吞噬细胞的活动(细胞松弛素),绝育(黄曲霉毒素)等^[1]。

目前对毒素机理的研究多限于组织解剖学的观察。武艺^[30]用白僵菌素的粗提物作用于草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith))体外培养细胞 Sf-21,发现毒素可严重破坏细胞的超微结构,细胞膜破碎,胞内物质外流,核物质大量丢失,出现染色质团块。

白僵菌素的致病机理认为:白僵菌素是一种 K^+ 载体,但可触发胞质中 Ca^{2+} 的升高,而导致机体死亡。有两个理论解释:其一,白僵菌素作为 K^+ 载体,能非特异性地与微粒体膜上的活性残基相互作用,导致 Ca^{2+} 的流通;其二,白僵菌素引起质膜超极化,间接导致 Ca^{2+} 流通。 Ca^{2+} 流通激活了 Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶,导致 DNA 断裂,引发细胞衰亡。这意味着,非特异

性毒素可以间接增加 Ca^{2+} 的凝集,不需要特殊的表面受体即引起细胞死亡^[5]。

7 结语

目前对昆虫病原真菌毒素研究较多的是小分子环缩肽类和可降解寄主体壁的酶类,对其研究主要还是集中在实验室内,直接应用于防治田间害虫的实例尚未见报道,原因主要:(1)毒素本身的毒力不强,在生产中不足以将害虫致死;(2)已发现的毒素主要表现为注射毒性,离应用于生产还有一定的距离或者说是生产中应用还不太现实;(3)毒素的提取工艺复杂,成本高,在生产中应用经济效益差。因此,昆虫病原真菌毒素这一研究领域尚有大量的工作要做。但是,由于昆虫病原真菌种类繁多,其代谢物也多种多样,产生毒性的作用方式也不尽相同,只要深入研究,完全可以找到在生产上有实用价值的昆虫病原真菌分泌的代谢产物。只要找到了有实用价值的毒素,便可以利用分子生物学的手段克隆出该毒素的基因,然后进行转基因育种,将毒素基因导入作物或树木体内使其表达,从而达到防治病虫害的目的。这是一很有前景的研究领域,目前国内外的很多实验室都在进行这方面的研究,好多可降解昆虫体壁酶的基因已被克隆,但尚未见报道转基因育种成功的实例。

参考文献:

- [1] 蒲蜚龙,李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996
- [2] 王成树. 球孢白僵菌分子生态学研究[D]. 北京:中国农业大学,2001
- [3] Kodaira T. Studies on the new toxic substance to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Isolation and purification of destruxin A and B[J]. Agr Biol Chem, 1961, 26:36~42
- [4] Mollier P, Lagnel J, Quiot J M, et al. Cytotoxic activity in culture filtrates from the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1994, 64:208~213
- [5] 林雅兰,黄秀梨. 现代微生物学与实验技术[M]. 北京:科学出版社,2000
- [6] Vining L C, Kelleher W J, Schwartim A E. Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *America muscaria*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8:931~933
- [7] El-Basyouni S H, Brewer D, Vining L C. Pigments of the genus *Beauveria*[J]. Canadian Journal of Botany, 1968, 46:441~448
- [8] Wat C K, McInnes A G, Smith D G, et al. The yellow pigments of *Beauveria* species, structures of tenellin and bassianin[J]. Canadian Journal of Chemistry, 1977, 55:4090~4098
- [9] Cole R J, Kirksey J W, Culter H G, et al. Toxic effects of oosporein from *Chaetomium trilaterale*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977, 22: 517~520
- [10] Eyal J, Mabud M D A, Fischbein K L, et al. Assessment of *Beauveria bassiana* NOV. EO-1 strain, which produces a red pigment for microbial control[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994, 44:65~80
- [11] Jeffs L B, Khachatourians G G. Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes[J]. Toxicom, 1997, 35(8):1351~1356
- [12] Dresner E. The toxic effects of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill on insects[J]. J N Y Entomol Soc, 1950, 58: 269~278
- [13] Cordon T C, Schwartz J H. The fungus *Beauveria tenella*[J]. Science, 1962, 138: 1265~1266
- [14] Bidochka M J, Khatourians G G. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1991, 58:106~117
- [15] Chamley A K. Physiological aspects of destructive pathogenesis by fungi: A speculative review[A]. In: Anderson J M, Rayner A D, Walton D W H. Invertebrate Microbial Interactions[C]. London: Cambridge University Press, 1984. 229~270
- [16] Khachatourians G G. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi[A]. In: Karora D, Ajello L, Mukerji K G. Handbook of Applied Mycology, Vol. 2, Humans, Animals and Insects[C]. New York: Deker, 1991. 613~663

- [17] St. Leger R J , Hajek A E , Staples R C , et al. Fungi for the biocontrol of insects: Tools and trends[A]. In: Stahl U Tudzynski P. Proc of the EMBO Workshop , Berlin , August 24 - 29[C]. Weinheim: vch, 1991. 45 ~ 63
- [18] 胡锦涛, 文建雷, 樊美珍, 等. 球孢白僵菌对马尾松毛虫的毒力与有关生化指标的关系. 不同世代白僵菌胞外蛋白酶毒力[J]. 西北林学院学报(自然科学版), 1993, 8(4): 36 ~ 40
- [19] 樊美珍, 胡锦涛, 李农昌, 等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶及其毒力关系的研究[J]. 微生物学通报, 1994, 21(4): 202 ~ 206
- [20] 裴炎, 冀志霞, 杨星勇, 等. 绿僵菌分解昆虫外壳蛋白酶 MAP-21 的纯化与特性[J]. 微生物学报, 2000, 40(3): 306 ~ 311
- [21] 杨星勇, 王中康, 夏玉先, 等. 球孢白僵菌凝乳弹性蛋白酶(BbPr1)的纯化与特性[J]. 菌物系统, 2000, 19(2): 254 ~ 260
- [22] Cole S C J , Charnley A K , Cooper R M. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1993, 113: 189 ~ 196
- [23] Urtz B E , Rice W C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*[J]. Mycology Research, 2000, 104(2): 180 ~ 186
- [24] Kim H K , Hye H S , Suh D S , et al. Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin , an insect cuticle-degrading serine protease[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21: 777 ~ 783
- [25] Bogo M R. A chitinase encoding gene (chit1 ,gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and characterization of genomic and full-length cDNA[J]. Current Microbiology, 1998, 37: 221 ~ 225
- [26] Mollier P , Lagnel J , Fournet B , et al. A glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1994, 64: 200 ~ 207
- [27] 张永军, 彭国雄, 方卫国, 等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶及类枯草杆菌蛋白酶的诱导[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(2): 182 ~ 186
- [28] Sharma S , Agarwal G P , Rajak R C. Effect of temperature ,pH and light on toxin production by *Beauveria bassiana* (bal) Vuill[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 1992, 30: 918 ~ 919
- [29] 李农昌, 樊美珍, 朱玮, 等. 绿僵菌毒素的提取方法[J]. 林业科技通讯, 1989(10): 30 ~ 31
- [30] 武艺, 黄秀梨, 邓继先. 球孢白僵菌毒素对昆虫体外培养细胞的超微结构和细胞内总蛋白的影响[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 1999, 35(1): 114 ~ 118
- [31] 武艺, 黄秀梨, 邓继先, 等. 球孢白僵菌毒素的分离、毒力检测及结构鉴定[J]. 微生物学报, 1998, 36(6): 468 ~ 474

Progress in Studies on Toxin of Entomopathogenic Fungi

LI Jian-qing¹, ZHANG Yong-an², ZHANG Xing-yao², YANG Zhong-qi², YUAN Feng¹

(1. College of Plant Protection, Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi, China;

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

Abstract : The recent research progress on the toxin of entomopathogenic fungi is reviewed. The toxins discovered can be classified in two groups according to their structure and function. One group is low-molecular-weight compounds including cyclodepsipetides, pigments, organic acids and others. The other is higher-molecular-weight proteins including proteases and protein toxins. Some toxins, such as, beauverin and destruxin, are listed in the paper. The culture conditions, the toxin isolation, bioassay and action mechanism are summarized.

Key words : entomopathogenic fungi; toxin; isolation or purification; *Beauveria*; *Metarhizium*