

# 昆虫病原真菌毒素对昆虫的作用机制研究进展\*

宋肖玲 李国霞\*\*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 上海 200025)

## Advance of Actional Mechanism for the Toxin of Entomopathogenic Fungi to Insects

Song Xiaoling Li Guoxia

(Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,  
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China)

关键词: 真菌毒素, 作用机制, 钙离子通道, 免疫抑制, 昆虫

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)03-0388-05

昆虫病原真菌是昆虫病原微生物中一个最大的类群, 约有 750 多种, 寄主范围较广, 可寄生 5 个目 24 个科 200 余种昆虫。1879 年 Metchnikoff 用绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)防治奥国塞丽金龟(*Anisoplia austriaca*)获得成功, 并且生产出大量用于生物防治的绿僵菌孢子产品<sup>[1]</sup>。随后昆虫病原微生物用来防治害虫的研究与应用渐多, 到目前为止已有 50 多种真菌制剂在世界各国注册使用<sup>[2]</sup>。

毒素被认为是昆虫病原真菌对付昆虫的一种有效手段。Suzuki<sup>[3]</sup>和 Champlin<sup>[4]</sup>分别从患病死亡的昆虫和从感染真菌病的昆虫体内分离、探测到了真菌毒素, 用分离到的真菌毒素处理昆虫后与该真菌感染昆虫后得到了相似的结果<sup>[5]</sup>。Kershaw<sup>[6]</sup>研究发现, 虫体内真菌毒素的产量与昆虫被真菌感染致死时(LT<sub>50</sub>)及死亡率显著相关, 而且 Ferron<sup>[7]</sup>认为真菌毒素是许多半知菌亚门真菌感染昆虫后死亡的真正原因。昆虫病原真菌毒素能引起部分致病效应并可加快昆虫的致死进程<sup>[8]</sup>。近年来昆虫病原真菌毒素对昆虫的作用虽然研究报道增多, 但迄今为止对其作用机制国内外尚无系统报道。目前国外对绿僵菌的破坏菌素(Destruxin)和白僵菌素(Beauvericin)的研究较多, 尤以破坏菌素的研究较为系统, 因此, 本文以此为重点介绍真菌毒素及其对昆虫的作用机制研究进展。

### 1 昆虫病原真菌毒素的种类和作用方式

Dresner 1947 年观察到白僵菌(*Beauvercia bassiana*)菌丝的丙酮蒸气浸出物在高度稀释后对于某些蚊虫幼虫具有明显的毒杀作用, 同时这种正在萌发的菌类的分泌物引起家蝇(*Musca domestica*)致死<sup>[9]</sup>。随后生物学者陆续在金龟子绿僵菌、白僵菌、蜡蚧轮枝菌(*Verticillium lecanii*)、汤普森森毛孢(*Hirsutella thompsonii*)及块状耳霉(*Conidiobolus thromboides*)等多种昆虫病原真菌的培养基中发现了真菌杀虫毒素的

\* 中国科学院院长基金特别支持项目资助(101CN0506)

\*\* 通讯作者

作者简介 宋肖玲(1977-), 女, 河南省安阳人, 中国科学院上海植物生理生态研究所读硕士生, 主要从事昆虫病原微生物及其代谢产物的研究。

收稿日期 2001-06-21, 修回日期 2001-17-02

存在<sup>[10]</sup>。绿僵菌的破坏菌素是第一个被系统研究的环状缩肽类昆虫病原真菌毒素,是该菌的主要杀虫毒素。该毒素种类很多,其中破坏菌素 A 和 E 杀虫活性最强,Loutelier<sup>[11]</sup>利用快离子轰击质谱(Fast atom bombardment mass spectrometric)和高压液相色谱仅在菌株 Ma23 中就得到了 12 种不同的破坏菌素。白僵菌的毒素有环状羧基肽(cyclodepsipeptide)白僵菌素、类白僵菌素(Beauverolides)以及白僵菌交酯(Bassianolide)和吡啶二羧酸(Dipicolinic acid),其中两者在蜡蚧轮枝菌中也有产生<sup>[12,43]</sup>。汤普森被毛孢的杀虫毒素为多毛菌素(Hirsutellin),对昆虫细胞具有细胞溶解作用并可以抑制蛋白质的翻译<sup>[14]</sup>。

体外得到的真菌毒素可以通过接触、饲喂和注射对多种昆虫产生毒性效应,而且对不同昆虫的作用各异。它们对处理昆虫可产生胃毒和触杀作用。绿僵菌素和白僵菌素处理的叶子不易被植食性瓢虫和竹节虫若虫取食,蜡蚧轮枝菌的毒素粗提物对桃蚜(*Myzus persicae*)等害虫有较高的毒性<sup>[15,46]</sup>。胸腔注射真菌毒素不仅可以抑制昆虫的免疫系统<sup>[17]</sup>,影响马氏管和中肠的正常功能<sup>[18]</sup>,破坏宿主的生理平衡,并扰乱昆虫的蜕皮和变态<sup>[5]</sup>,而且还可以使昆虫肌肉发生强直性瘫痪,甚至可以引起死亡<sup>[19]</sup>。具有杀虫活性的破坏菌素中除破坏菌素 E 有直接的接触毒性外,其它均是通过胸腔注射或吞食后才表现出杀虫活性<sup>[12]</sup>。通过接触或饲喂有杀虫效应的毒素有望成为微生物杀虫剂或杀虫药剂的模式分子(前身),而对通过注射产生毒性效应的真菌毒素的研究有助于深入了解其产生菌的致病作用机理。

## 2 昆虫病原真菌毒素的作用机制

### 2.1 抑制昆虫的细胞免疫反应

真菌进入昆虫胸腔后,首先面临宿主免疫系统的抵抗。尽管昆虫的免疫系统比较原始,它们仍能对昆虫病原菌作出强烈的免疫反应甚至将其消灭<sup>[17]</sup>,而昆虫病原真菌毒素有助于抑制宿主的细胞免疫反应使真菌建立感染<sup>[20]</sup>。胸腔注射破坏菌素的典型反应是引起免疫抑制,同时该毒素可抑制体外培养浆细胞的免疫活性<sup>[12]</sup>。在昆虫体内生长时白僵菌可以明显降低浆细胞活性,使得白僵菌不易被浆细胞吞噬<sup>[21]</sup>;某些绿僵菌菌株因其分泌毒素可击败昆虫的免疫防御系统而成功感染昆虫<sup>[20,22]</sup>。

**2.1.1 降低吞噬性血细胞的数量** Mazel<sup>[5]</sup>用甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的健康血清和白僵菌感染后的感染血清分别处理甜菜夜蛾幼虫,均导致昆虫体内循环性血细胞的迅速减少,但是健康血清处理的血淋巴可以恢复正常,注射 3 小时后血细胞的数量即与正常相当,而感染血清处理的幼虫导致其循环性血细胞数量出现永久性减少( $P < 0.001$ )。

**2.1.2 改变浆细胞的形态和结构,诱导其程序性死亡** 患病昆虫的浆细胞细胞膜发生变化,染色体固缩,此现象与破坏菌素处理鳞翅目昆虫细胞株及其它靶细胞例如马氏管管壁细胞和中肠细胞产生的变化相同<sup>[23]</sup>。除此之外,用破坏菌素处理健康昆虫幼虫的浆细胞,两小时后浆细胞呈圆球形,不能形成线状伪足,细胞表面有气泡形成<sup>[19]</sup>。用 FITC-鬼笔环肽标记感染白僵菌的幼虫血细胞,结果血细胞细胞骨架发生了明显的改变,细胞染色发现浆细胞肌动蛋白丝和维管束的形成受到抑制<sup>[21]</sup>。

研究表明破坏菌素对靶细胞的典型毒性效应是通过毒素与膜表面受体分子的结合而发生并引起钙离子内流<sup>[23]</sup>。Matha<sup>[24]</sup>通过放射性标记的实验模拟证明了昆虫细胞表面中有破坏菌素的靶分子受体存在。毒素与膜上受体的结合激活了与细胞膜相连的蛋白激酶,蛋白激酶随后去磷酸化激活细胞内部的一系列靶蛋白,层粘连蛋白及组蛋白 H1 的磷酸化引起细胞核的膨胀和染色体固缩<sup>[19]</sup>从而使得其活性受到抑制。Qui<sup>[25]</sup>等发现体外实验用破坏菌素 E 处理昆虫细胞株可强烈快速的抑制 DNA 和 RNA 的合成,当其浓度低至  $0.005 \mu\text{g}/\text{mL}$  时这种抑制作用也可以发生。蛋白激酶还可以激活跨膜的细胞粘附蛋白,例如纤连蛋白受体,使得粘着斑和细胞粘着的其它位点被部分破坏,与之相连的肌动蛋白丝从细胞质膜上分离下来<sup>[19]</sup>。由于不能形成功能性骨架,其依赖功能性骨架来完成细胞运动的能力受到损伤。

因为细胞核膨胀,染色体固缩和空泡化是细胞程序性死亡的典型性特征,这些形态改变说明破坏菌素可能诱导浆细胞的程序性死亡,实验也证实破坏菌素 E 处理的昆虫浆细胞有很高的死亡率<sup>[19]</sup>。

**2.1.3 降低浆细胞的吞噬活性,抑制包囊体形成** 绿僵菌释放的破坏菌素在战胜昆虫宿主的细胞免疫

反应中占主导地位<sup>[17]</sup>。由于浆细胞形态和细胞骨架发生了改变,使得附着和扩散作用受到抑制,从而引起浆细胞吞噬活性下降,血细胞包裹化受到抑制<sup>[19,26]</sup>。在沙漠蝗(*Schistocerca gregaria*)中对血细胞包裹化防御反应的抑制可引起各种非寄生物在其体内大量发生<sup>[21]</sup>。昆虫真菌病后期从感病昆虫分离的浆细胞表现出对酵母型细胞和芽生孢子的吞噬活性减弱,毒素以亚致死剂量加入昆虫血淋巴培养液或者以真菌细胞为载体被浆细胞吞噬时,浆细胞吞噬活性下降<sup>[19]</sup>。在这两种情况中浆细胞死亡率高达80%,意味着破坏菌素A对浆细胞吞噬活性的抑制是通过直接的细胞毒性进行。以上结果充分表明浆细胞参与细胞免疫的能力已被真菌病程中释放的毒素所损伤。

## 2.2 引起体液免疫中酚氧化酶活性的改变

昆虫对外来物质的另一个识别机制是体液免疫的酚氧化酶作用系统,它们主要位于浆细胞<sup>[17]</sup>。酚氧化酶系通常情况不活化,仅在昆虫变态、受伤害和感染时活化,并在血细胞的吞噬作用、血细胞团块形成(即包裹化)中的粘附作用、杀死微生物及细胞通讯中有重要的作用。用谷胱甘肽处理昆虫,可以通过减少昆虫体内真菌繁殖体的黑化而不是影响血细胞集聚即可导致昆虫致死率的增加<sup>[27]</sup>。

真菌侵入昆虫后可引起酚氧化酶活性的增加异常或过于激烈造成虫体的迅速黑化,缩短致死时间<sup>[28]</sup>。白僵菌通过释放毒性物质到血淋巴导致血清酚氧化酶活性的增加<sup>[17]</sup>。然而 Huxham<sup>[29]</sup>通过体外研究认为,绿僵菌通过释放破坏菌素抑制沙漠蝗和美洲大蠊(*Periplaneta americana*)中的酚氧化酶活性,使得酚氧化酶参与体液免疫的功能被破坏。白僵菌感染血清处理的甜菜夜蛾幼虫不产生即刻的瘫痪而是破坏该幼虫的变态,大多数处理幼虫死于徘徊阶段,体表布满黑色斑。这可能是浆细胞和酚氧化酶级联反应非特异性的诱导作用导致变态不能正常进行,或者是因为感染血清引起的血细胞功能丧失破坏了组织崩解和变态所需进行的同化事件<sup>[5]</sup>。

## 2.3 使昆虫体壁肌肉细胞发生僵直

实验证明破坏菌素可通过维持细胞内钙离子水平来发生细胞毒性,这种效应依赖钙离子和镁离子浓度并能被氯化镉和高浓度的硝基吡啶所阻断<sup>[30]</sup>。鳞翅目幼虫血腔被注射破坏菌素后呈现典型的强直性瘫痪或松弛状态,是由于破坏菌素使得体壁肌肉中内源钙离子通道发生了去极化所致<sup>[23]</sup>。其可能机制是:破坏菌素首先与膜上的受体结合从而引起了膜上大分子的快速磷酸化,并打开钙离子通道使得钙离子内流。体外用破坏菌素A处理鳞翅目昆虫细胞株导致细胞内钙离子水平逐渐增加,并于处理30分钟后达到显著水平。破坏菌素的连续刺激引起胞内钙离子水平持续增加,钙离子不断活化各种钙结合蛋白从而引起细胞反应,肌纤维发生强直收缩<sup>[23]</sup>。用汤普森被毛孢毒性培养液注入家蚕(*Bombyx mori*)体内得到的家蚕肌肉组织切片中,肌纤维中出现明显空洞<sup>[20]</sup>。

破坏菌素处理昆虫细胞后导致的稍后的钙离子内流是这一类真菌毒素发生作用的一个方面,其诱导的肌肉或血细胞的钙离子通道打开的具体机制还不清楚。破坏菌素可能是通过胞内钙离子增加及膜内蛋白酶磷酸化的级联反应最终导致了肌肉瘫痪和机体内靶组织坏死和功能丧失。

## 2.4 抑制马氏管的分泌和中肠的正常功能

破坏菌素还可通过对细胞毒性抑制或破坏马氏管和中肠的功能。Vey<sup>[31]</sup>观察到腐败菌素对大蜡螟(*Galleria mellonella*)幼虫马氏管的毒性效应主要表现为细胞超微结构的损害,有致死效应的腐败菌素E主要破坏昆虫中肠细胞,引起线粒体、内网膜及核膜的变化,而无神经肌肉的损伤<sup>[12]</sup>。研究发现腐败菌素处理后马氏管膨胀,管壁变薄,有些部位形成空泡;马氏管和中肠的管壁上皮细胞的细胞质密度降低,细胞核仁固缩,核质变清,染色体紧密地聚集在核外围,形态改变的上皮细胞的脱落导致了部分或全部中肠内腔的堵塞<sup>[20]</sup>。

破坏菌素可以抑制沙漠蝗马氏管分泌流体,抑制效应与破坏菌素剂量有关而与钙离子无关<sup>[18]</sup>。如破坏菌素A的致死中浓度(LC<sub>50</sub>)是23μmol/L,当用正常培养液洗涤被破坏菌素A处理离体的马氏管后,马氏管的分泌能力有所恢复,但显著低于最初分泌水平。用钙离子阻断剂氯化镉预先处理烟草天蛾(*Manduca sexta*)马氏管(用量足以防止其肌肉去极化),结果不能防止破坏菌素对其分泌作用的抑制。阳

离子阻断剂 SITS (4-acetamido-4'-isothio-cyanatostilbene-2,2'-disulphonnic acid) 可以逐步减少沙漠蝗马氏管对分泌的分泌,然而却不能阻断破坏菌素对马氏管的正常抑制作用。沙漠蝗的利尿激素可以通过刺激马氏管细胞内环腺苷酸(cAMP)水平的增加而促使其分泌,而破坏菌素几乎能完全抑制利尿激素的作用(93%)。这表明钙离子通道或者阳离子通道都不直接参与破坏菌素对马氏管的毒性效应。

### 2.5 抑制蜕皮甾类激素的分泌和转运

破坏菌素可以抑制昆虫蜕皮甾类激素(Ecdysteroid)的分泌。抑制效应主要与毒素浓度有关,微量破坏菌素(0.5 $\mu$ g/mL)可以抑制分泌水平的一半。对烟草天蛾试验表明罹绿僵菌病的虫体一个基本后果就是引起前胸腺不能分泌蜕皮甾类激素,从而导致不能蜕皮或推迟蜕皮<sup>[8]</sup>。绿僵菌感染的昆虫还表现出一些其它症状,例如进食减少、逐渐瘫痪等,这可能是由于蜕皮的延迟导致的一些其它效应<sup>[8,49]</sup>。

在正常情况下,沙漠蝗前胸腺中促胸腺激素对蜕皮甾类激素产生的精确调控,主要是通过增加细胞内钙离子水平来完成的<sup>[32]</sup>,而Slomar<sup>[8]</sup>等试验证明破坏菌素对前胸腺蜕皮激素分泌的抑制效应明显不受cAMP和钙离子的影响。沙漠蝗前胸腺细胞上有电压敏感的钙离子通道存在<sup>[33]</sup>,然而诱导钙离子内流是刺激蜕皮甾类激素的产生而不是抑制其分泌;尽管体外用cAMP或可以增加钙离子水平的处理都能刺激前胸腺分泌蜕皮甾类,而破坏菌素处理后可以间接增加cAMP水平的处理却不导致前胸腺的分泌<sup>[32]</sup>。因此在沙漠蝗前胸腺中,破坏菌素可能不诱导钙离子的内流,而是抑制它们的产生。昆虫病原真菌毒素还可通过在昆虫蜕皮过程中对其体壁皮细胞层的破坏来影响蜕皮甾类激素的转运<sup>[34]</sup>。

### 2.6 对脂肪体和体壁皮细胞层的影响

绿僵菌毒素被叩头虫的新生体壁吸收后,皮细胞则变成一种圆形退化的细胞:细胞质密度下降,粗面内质网囊泡化,线粒体呈圆形、脊退化、基质很少,核质密度降低,多个细胞的圆形核仁和染色体固缩成一个大的球形,在其上染色丝疏松折叠或者形成紧密折叠的颗粒状,而且这些细胞中缺乏糖原和高尔基体,从病理学上表明它们的分泌和转运机制部分受到损害。皮细胞中核质、粗面内质网和线粒体的片层结构受到损害从而使代谢活性丧失,失去了此阶段正常皮细胞对表皮沉积所需的微绒毛,从而抑制了蜕皮后正常表皮层的形成<sup>[34,35]</sup>。

脂肪体和体壁皮细胞层是宿主主要的蛋白质合成位点。Vey<sup>[20]</sup>研究发现汤普森被毛孢的代谢粗提液引起脂肪体和真皮(Hypodermis)细胞的核仁固缩,细胞质密度降低,而后发现其杀虫蛋白多毛菌素A能够抑制蛋白质的翻译<sup>[14]</sup>。然而,也有报道表明白僵菌在大蜡螟血淋巴内的复制对脂肪体及皮细胞的合成能力没有明显影响,即使到菌丝生长的最后阶段都没有发现宿主合成蛋白质能力的改变;通过放射自显影显示,在体液免疫反应中仅有个别蛋白质例如酯酶的合成受到影响<sup>[22]</sup>。

## 3 结语

昆虫病原真菌毒素可以帮助病原真菌对昆虫建立快速感染并缩短昆虫的死亡时间,使得对其继续深入研究具有重要的理论和应用价值。目前,对昆虫病原真菌毒素的作用机制的报道还为数不多,其研究结论主要是通过研究真菌体外产生的毒素而获得的。虽然在患真菌病的昆虫体内曾经探测到了破坏菌素和白僵菌素的存在,然而对于许多昆虫病原真菌毒素在昆虫体内的产生情况如产生的途径、条件、量等还缺乏了解。这就需要结合现代生物学检测分析手段,加强对真菌和昆虫相互作用的研究,有待于进一步揭示真菌毒素的作用机理。

对昆虫病原真菌毒素作用机制的研究报道,迄今为止大多限于细胞和亚细胞水平的形态学观察和生理学研究,涉及到分子机理的研究还很欠缺。在生物体这个复杂的信息调控网络中,人类对昆虫病原真菌毒素在虫体中从分泌到血腔、机体再进入细胞产生毒性效应这个过程及其机制的了解还十分有限;而且不同昆虫病原真菌毒素可能有独特的作用机理,这就需要发现新的毒素种类和开展对多种毒素的研究,不断丰富和完善该类毒素的作用机制。加强其分子机理的研究不仅可以给生物防治及环境保护提供重要理论基础,而且对细胞信号传导、基因调控的研究有潜在的理论价值。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 张宗炳,曹 骥. 害虫防治 策略与方法. 北京: 科学出版社, 1990. 388 ~ 409.
- [ 2 ] 李增智,樊美珍. 真菌生物技术与真菌杀虫剂的发展. 见: 喻子牛等主编. 微生物农药及其产业化. 北京: 科学出版社, 2000. 115 ~ 121.
- [ 3 ] Suzuki A, Kawakami K, Tamuras. *Insect Biochem Molec Biol*, 1971, **3**: 43 ~ 46.
- [ 4 ] Champlin F R. *Appl Environ Micro*, 1979, **37**: 1122 ~ 1125.
- [ 5 ] Mazet I, Hung S Y, Boucias D G. *Experientia*, 1994, **50**: 142 ~ 147.
- [ 6 ] Kershaw M L, Moorhouse E R, Bateman R. *J Invert Patho*, 1999, **74**: 213 ~ 223.
- [ 7 ] Ferron P. Microbial control of pests and plant disease 1970 - 1980. London: Academic Press, 1981. 465 ~ 482.
- [ 8 ] Sloman A S, Reynolds S E. *Insect Biochem Molec Biol*, 1993, **23**: 43 ~ 46.
- [ 9 ] Steinhaus E A 原著. 张景欧等译. 昆虫病理学原理 (下册). 北京: 科学出版社, 1977. 395 ~ 502.
- [ 10 ] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996. 76 ~ 111.
- [ 11 ] Loutelier C, Cherton J C, Lange C, et al. *J Chrom A*, 1996, **738**: 181 ~ 189.
- [ 12 ] Gillespie A T, Claydon N C. *Pestic Sci*, 1989, **27**: 203 ~ 215.
- [ 13 ] 胡丰林, 樊美珍, 李增智. 菌物系统, 2000, **19**: 522 ~ 528.
- [ 14 ] Boucias D G, Farmerie W G, Pendland J C. *J Invert Patho*, 1998, **72**: 258 ~ 261.
- [ 15 ] 李国霞, 高希武, 刘青春等. 北京农业大学学报, 1995, **21**: 409 ~ 415.
- [ 16 ] Roberts D W, Yendol W G. 真菌在昆虫微生物防治中的应用. 见: H D 伯吉斯等主编. 广东农林学院等译. 昆虫和螨类的微生物防治. 北京: 科学出版社, 1977. 85 ~ 101.
- [ 17 ] Robert A S, Harry C E, Jean-Paul L. Atlas of entomopathogenic fungi. Netherlands: Wetenschappelijke uitgeverij Bunge, 1988. 128 ~ 139.
- [ 18 ] James P J, Kershaw M J, Reynolds S E. *J Insect Physiol*, 1993, **39**: 797 ~ 807.
- [ 19 ] Vilcinskas A, Matha V, Gotz P. *J Insect Physiol*, 1997, **43**: 1149 ~ 1159.
- [ 20 ] Vey A, Quiot J M, Vago C. *J Invert Patho*, 1993, **61**: 131 ~ 137.
- [ 21 ] Hung S H, Boucias D G, Vey A. *J Invert Patho*, 1993, **61**: 179 ~ 187.
- [ 22 ] Vilcinskas A, Matha V. *Eur J Entomol*, 1997, **94**: 461 ~ 472.
- [ 23 ] Dumas C, Ravallec M, Matha V, et al. *J Invert Patho*, 1996, **67**: 137 ~ 146.
- [ 24 ] Matha V, Grubhoffer L, Weyda F, et al. *Cytobios*, 1990, **64**: 35 ~ 42.
- [ 25 ] Quiot J M. Effect of mycotoxins on invertebrate cells *in vitro*. In: Maramorosh K. Advances in cell Culture, Vol 4. New York: Academic Press, 1985. 199 ~ 212.
- [ 26 ] Gotz P. Encapsulation in arthropods. In: Brehelin M ed. Immunity in invertebrate. Berlin: Springer Verlag, 1986. 153 ~ 170.
- [ 27 ] Vey A, Fargues J. *J Invert Patho*, 1977, **31**: 207 ~ 215.
- [ 28 ] St leger R J, Charnley A K, Cooper R M. *J Invert Patho*, 1986, **47**: 167 ~ 177.
- [ 29 ] Huxham I M, Lackie A M, McCorkindale N J. An *in vitro* assay to investigate activation and suppression by a pathogenic fungus of prophenoloxidase by insect haemocytes. In: Samson R A, et al. Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. Foundat Fourth Int Collq Invert Patho. Netherlands: Wageningen, 1986. 463.
- [ 30 ] Bradfish G A. *Toxicon*, 1990, **28**: 1249 ~ 1254.
- [ 31 ] Vey A, Quiot J M. *Can. J Microbiol*, 1989, **35**: 1000 ~ 1008.
- [ 32 ] Smith W A, Gilbert L I. *Insect Biochem*, 1986, **16**: 143 ~ 147.
- [ 33 ] Eusebio E J, Moody W J. *J Exe Bio*, 1986, **126**: 531 ~ 536.
- [ 34 ] Zacharuck R Y. *J Invert Patho*, 1974, **23**: 13 ~ 21.
- [ 35 ] Zacharuck R Y. *Can J Micro*, 1971, **17**: 281 ~ 290.