

烟草农业

领导信箱

ldxx@tobacco.gov.cn

烟草论坛

留言板

电子邮件定制

短信互动

国家烟草专卖局总机

010-63605000

新闻投稿热线:

010-63606303

010-63605947

010-63605142

cx-out@tobacco.gov.cn

[首页](#)
[政务信息](#)
[行业资讯](#)
[社会服务](#)
[站内搜索](#) [搜索](#)
[办事大厅:](#)
[消费者](#)
[零售客户](#)
[烟农](#)
[烟草企业](#)
[信息公开:](#)
[信息公开目录](#)
[依申请公开](#)
[信息公开指南](#)

 当前位置 >>科技信息>>烟草农业 查看: [减小字体](#) [增大字体](#)

2007-05-10

取食CMV烟株的烟蚜谷胱甘肽S-转移酶和羧酸酯酶活性变化

烟蚜 *Myzus persicae* (Suler) 是传播黄瓜花叶病毒(CMV)、马铃薯Y病毒(PVY)和烟草丛矮病毒^[1]等多种病毒病的重要媒介昆虫。近年来,由于烟蚜在田间大量发生,烟草上各种病毒病害发生严重,对烟叶产量和质量均造成了较大影响。青玲等^[2]报道,在重庆烟区,烟草花叶病毒(TMV)病的发生较普遍,且有逐年加重的趋势,发病率为30%~40%,个别地区达50%以上。同时,由于农药的频繁使用,烟蚜对农药的抗性增加,导致化学农药防治效果降低,加剧了烟草病毒病的危害。谷胱甘肽S-转移酶(GSTs)是一类催化还原型谷胱甘肽(GSH)与各种亲电化合物的亲核加成反应酶,具有代谢多种农药的能力,研究表明昆虫对杀虫剂抗性与GSTs活性有关^[3]。羧酸酯酶(CarE)在对有机磷化合物的解毒中起着重要作用^[4],杀虫剂、寄主植物的次生化化合物均可激活GSTs和CarE^[5]。目前,对GSTs和CarE的研究主要集中在药剂的抗性、寄主和烟草品种方面^[6-8],尚未涉及将感染病毒病的烟草作为寄主研究烟蚜GSTs和CarE的活性。本试验以取食健康烟草的烟蚜为对照,研究了烟草黄瓜花叶病毒(CMV)毒株上烟蚜体内GSTs和CarE的活性,旨在为通过杀虫剂治蚜防治TMV病提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 供试虫源

供试品种云烟85,烟蚜于2004年8月采自重庆市武隆烟田,带回实验室转移到健康烟苗,饲养一代后取未取食的1龄若虫转移到健康烟苗上饲养,繁殖15代后备用(对照);同时,取无毒烟蚜,转移到接种CMV并发病的烟苗上饲养,繁殖

15代后备用(处理)。烟蚜的饲养均在室内温光培养箱中,温度(25 ± 1)℃,光照周期 L:D = 16h:8h,相对湿度 70% ~ 80%。

1.2 酶活力测定

1.2.1 GSTs 活力及动力学参数的测定

参照 RANCH 等^[9]的方法并稍作改动。分别挑取取食健康烟苗和感染 CMV 病毒烟苗的单头无翅成蚜,用 300 μL 冷冻 Tris - HCl 缓冲液(0.05mol/L, pH7.5)匀浆,4℃、10000rpm 条件下离心 5min,上清液作为酶源。反应总体积为 300μL,CDNB 和 GSH 的终浓度为 0.6 和 6mmol/L,在 25℃,反应 10min 后,在 340nm 下用酶标仪记录 5min 内吸光值(OD 值)的变化。

参照 RAUCH 等^[9]的测定 GSTs 动力学参数法,分别以 CDNB 和 GSH 为底物时测定 GSTs 的米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_{max}), K_m 和 V_{max} 值采用双倒数作图法求得,均设置 5 次重复。

依照下式^[10]计算酶活力:

$$\text{GSTs 活力单位 (nmol/min)} = \Delta\text{OD}_{340} \cdot v / \varepsilon \cdot L$$

式中: ΔOD_{340} ——每分钟光吸收的变化值($\Delta\text{OD}_{340}/\text{min}$); v ——酶促反应体系(mL); ε ——产物的消光系数(0.0096 L/ $\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$); L ——比色杯的光程(1cm)。

$\text{GSTs 比活力 (nmol/min} \cdot \text{mg Pro)} = \text{酶活力单位/酶液蛋白含量}$

1.2.2 CarE 活力测定

分别挑取取食健康烟苗和感染 CMV 病毒烟苗的单头无翅成蚜,用 200μL 冷冻 PBS 缓冲液(0.04mol/L, pH 7.0)冰浴匀浆,4℃、10000 rpm 条件下离心 10 min,上清液作为酶源。反应总体积为 200μL,取底物 100μL 0.03 mol/L 的 α -萘酚加到酶标板孔中,然后再加入 75μL 酶液,于 30℃下反应 10min,加入 25μL 显色剂,于 30℃下反应 10min,混匀,在 600nm 下比色,测定其 OD 值。比活力 = 产物量/蛋白质含量。

1.2.3 标准曲线的制作

1.2.3.1 牛血清蛋白标准曲线

参照 ABDEL-AAL 等^[11]的方法,以牛血清白蛋白作标准曲线。

1.2.3.2 α -萘酚标准曲线

分别取各浓度 α -萘酚,加到酶标板孔中,重复 5 次,对照加入 100μLPBS(0.02mol/L, pH 7.0),再分别加入 75μLPBS(0.02mol/L, pH7.0),25μL

显色剂,于30℃反应10min,600nm比色测定其OD值。各浓度所测OD值减去对照OD值,以 α -萘酚浓度为X轴,OD值为Y轴,制作标准曲线。

2 结果与分析

2.1 烟蚜酶原蛋白含量

根据标准曲线和所测酶液的OD值,计算出取食发病烟苗的烟蚜酶原蛋白含量为 $(41.104 \pm 0.18194) \mu\text{g}/\text{mL}$,是健康烟苗的2.05倍。经过独立样本t检验,二者之间存在极显著差异($t = -22.218, df = 113, P < 0.01$)。

2.1 烟蚜 GSTs 的活性

采用微量滴度酶标板法对2种饲养条件下烟蚜GSTs活性进行测定。结果(表1)显示,在健康和发病烟苗上饲养的烟蚜GSTs比活力分别为0.507和0.442 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$,因此,取食健康烟草烟蚜GSTs的活性较高。

2.2 烟蚜 GSTs 动力学参数

采用微量滴度酶标板法对烟蚜GSTs的动力学参数进行了测定。借助双倒数作图法,分别以CDNB和GSH为底物,得到双倒数曲线图,见图2与图3。

烟蚜GSTs对底物CDNB和GSH的 K_m 和 V_{max} 值,见表2。结果表明,当以CDNB为底物时,带毒烟苗上饲养的烟蚜 K_m 值与健康烟苗上的相比有显著提高,说明带毒烟苗上烟蚜GSTs对CDNB的亲合力明显下降;以GSH为底物时,同样发病烟苗上饲养的烟蚜 K_m 值显著高于健康烟苗,说明发病烟苗上烟蚜的GSTs对GSH的亲合力也有明显下降。

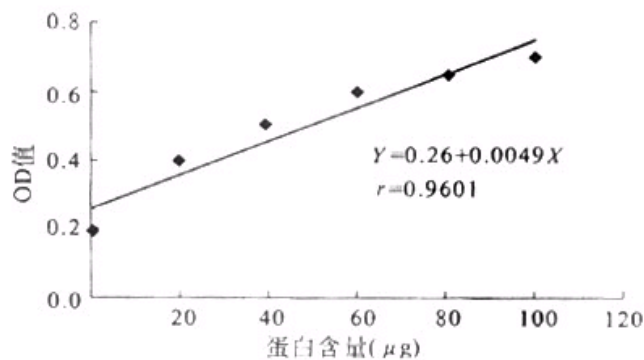


图1 牛血清蛋白标准曲线

表 1 烟蚜谷胱甘肽 S-转移酶活性的比较¹ (平均数 ± SE)

寄主/Hosts	GSTs 活性/GSTs activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	GSTs 比活力/Specific activity of GSTs ($\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	比值/Ratio
对照/CK	0.2078 ± 0.01191a	0.507 ± 0.00287a	1
处理/Treatment	0.08462 ± 0.00464b	0.442 ± 0.00231b	0.87

注:①英文字母不同者表示差异显著,下同。

表 2 烟蚜谷胱甘肽 S-转移酶动力学参数的比较 (平均数 ± SE)

寄主/ Hosts	CDNB		GSH	
	米氏常数/ K_m (mmol/L)	最大反应速率/ V_{max} (mmol/min)	米氏常数/ K_m (mmol/L)	最大反应速率/ V_{max} (mmol/min)
对照/CK	50.0758 ± 1.2561a	0.2105 ± 0.0855a	35.0428 ± 1.2533a	0.5980 ± 0.0532a
处理/Treatment	323.7468 ± 9.6325b	0.2899 ± 0.05633b	49.2928 ± 2.0323b	0.4652 ± 0.0366b

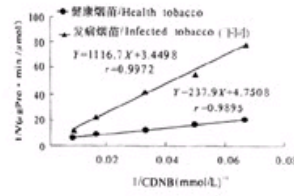


图 2 不同 CDNB 浓度下烟蚜 GSTs 的双倒数曲线

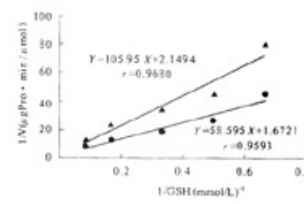


图 3 不同 GSH 浓度下烟蚜 GSTs 的双倒数曲线

2.3 CarE 活性

采用微量滴度酶标板法对 2 种饲养条件下烟蚜 CarE 活性进行测定。结果表 3 显示,发病烟苗饲养的烟蚜 CarE 比活力高于健康烟苗饲养的烟蚜,是健康烟苗上饲养的烟蚜 CarE 比活力的 1.95 倍。

2.4 CarE 活性的个体分布频率

对烟蚜进行 CarE 活性测定,统计不同活性段内的烟蚜个体分布频率,结果见图 4。图 4 表明发病烟草饲养的烟蚜 73.33% 的个体 CarE 活性在 0.3 ~ 0.4 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ 之间,而健康烟草饲养的烟蚜 97.37% 的个体 CarE 活性在 0.3 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ 以下,只有 2.63% 的个体 CarE 活性在 0.3 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ 以上。发病烟草饲养烟蚜的 CarE 活性显著高于健康烟草。

表 3 烟蚜羧酸酯酶 CarE 活力的比较 (平均数 ± SE)

寄主/Hosts	CarE 比活力/ Specific activity of CarE ($\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	比值/Ratio
对照/CK	0.1858 ± 0.0560a	1.00
处理/Treatment	0.3618 ± 0.0456b	1.95

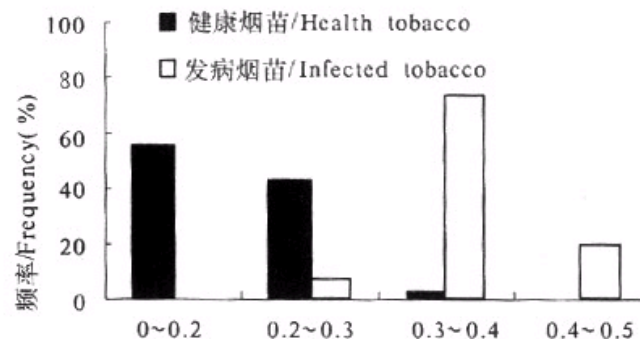


图4 烟蚜 CarE 活性个体频率分布

3 小结

本研究结果表明,烟草 CMV 病株对烟蚜体内的 GSTs 和 CarE 均有显著影响,CMV 毒株上饲养的烟蚜 GSTs 活性低于健康烟苗,CarE 活性高于健康烟苗,这可能是因为烟草 CMV 毒株中所含的营养物质和次生代谢物质发生了改变,同时,由于烟蚜取食感病烟苗,病毒粒子会随着汁液进入烟蚜体内,可能对烟蚜体内 GSTs 和 CarE 活性产生影响。但哪些物质发生了变化,尚需要进一步研究。

(西南大学植物保护学院昆虫学及害虫控制工程重点实验室)

张玲 刘映红 陈志永

摘自《烟草科技》2007年第3期



主管: 国家烟草专卖局办公室

地址: 中国北京西城区月坛南街55号(100045)

建议使用: 800*600分辨率以上, IE5.0以上浏览器

未经许可, 本网站包括图像、图标、文字在内的所有数据不得转载

主办: 国家烟草专卖局信息中心

备案序号: 京ICP备05033420号