

菜青虫感染金龟子绿僵菌后体内几种保护酶活性的变化

李世广*, 窦婷婷, 付小伶, 刘祝琴, 何超

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘要 为了明确菜青虫感染金龟子绿僵菌后体内的防御机制,采用分光光度法测定了菜青虫被金龟子绿僵菌感染后体内保护酶活性的变化。结果表明,用金龟子绿僵菌处理后菜青虫体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)均呈现先上升后下降趋势,反映出菜青虫在金龟子绿僵菌侵染初期防御能力增强,后期降低。其中,SOD、POD和CAT活力分别在接种后36、24和48 h达到高峰,说明菜青虫在抵抗金龟子绿僵菌侵染过程中,首先发生作用的保护酶是POD,随后为SOD,而CAT是最后发生作用的保护酶。

关键词 菜青虫; 金龟子绿僵菌; 超氧化物歧化酶; 过氧化物酶; 过氧化氢酶

中图分类号: S 476.12 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.03.022

Changes of protective enzyme activities in *Pieris rapae* infected by *Metarhizium anisopliae*

Li Shiguang, Dou Tingting, Fu Xiaoling, Liu Zhuqin, He Chao

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract To understand the defense mechanisms of *Pieris rapae* against *Metarhizium anisopliae*, this study used spectrophotometry to assay the activities of protective enzymes of *P. rapae* infected by *M. anisopliae*. The results indicated that, the activities of SOD, POD and CAT in the infected *P. rapae* were increased at initial infection stage, but dropped at the later infection stage, suggesting that the defense system of *P. rapae* was enhanced during initial period, but dropped during the later period. The highest activities of SOD, POD and CAT were observed at 36 hours, 24 hours and 48 hours after inoculation, respectively, which indicated that POD played an important role in defending against the invasion of *M. anisopliae*, and then SOD functioned after invasion, while the last effective protective enzyme was CAT.

Key words *Pieris rapae*; *Metarhizium anisopliae*; superoxide; peroxidase; catalase

菜青虫为鳞翅目粉蝶科菜粉蝶(*Pieris rapae*)的幼虫,是十字花科植物的重要害虫,除啃食叶肉为害之外,还可引起软腐病的流行,危害十分严重^[1]。

目前,我国对于农业害虫的防治还集中于化学防治上,但大量化学农药的使用已经使得环境不堪重负,在害虫产生抗药性的同时,大量的农药残留也对人类自身的健康产生极大的威胁。因此,寻找能够有效防治农业害虫的生物方法显得尤为重要。绿僵菌[*Metarhizium* (Metsch.) Sorokin]是一类广谱性虫生真菌,能侵染200多种农林害虫,对人、畜、作物安全^[2-3]。国内外运用绿僵菌防治农业害虫的研

究已有不少报道^[4],有关昆虫保护酶的研究报道也有很多,但大多数还集中在昆虫保护酶与昆虫抗药性关系之间的研究^[5-7]。关于昆虫病原真菌与昆虫保护酶关系的研究也略有报道^[8-10]。而被绿僵菌侵染后菜青虫体内保护酶活性变化尚未见报道。

以往的研究表明,菜青虫体内存在着超氧化物歧化酶(superoxide, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)等保护酶。当昆虫病原真菌附着在菜青虫体壁,菌丝进入胸腔后,菜青虫会启动机体内的保护酶系统进行防御,即菜青虫体内的SOD、CAT和POD三者协同作用,使

收稿日期: 2015-06-04 修订日期: 2015-06-24

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2011BAD12B04-02);安徽省教育厅重点项目(KJ2015A099);安徽农业大学学科骨干培育项目(2014XKPY-08)

* 通信作者 E-mail: lsg815@163.com

自由基维持在一个较低的水平,从而维持其正常的生理活动^[11]。作者利用筛选出的对菜青虫致病力较高(校正死亡率为96.4%,僵虫率达84.1%,LT₅₀为2 d,尚未发表)的金龟子绿僵菌 Ma60 菌株,研究了被该菌株侵染后菜青虫体内几种保护酶活力的变化,旨在为菜青虫的生物防治工作提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

金龟子绿僵菌 Ma60 菌株,由安徽农业大学植物保护学院生物防治研究室提供。

1.2 供试虫源

菜青虫采自安徽农业大学农翠园,将其放在安徽农业大学植保学院大棚温室内的白菜上饲养,待成虫产卵孵化后转为室内盆栽白菜饲养,选取健康活泼的4龄幼虫供试。

1.3 真菌分生孢子悬浮液配制

将 Ma60 菌株接种于 PDA 培养基平板上,在(25±1)℃条件下培养10 d,待真菌充分产生孢子后,将分生孢子粉刮到盛有10 mL 0.1% Tween-80 湿润剂的试管中,在涡旋混匀器上充分振荡30 min,用血球计数板计数,配制成孢子含量 1.0×10^8 个/mL的分生孢子悬浮液。

1.4 金龟子绿僵菌对菜青虫的侵染试验

将20头4龄菜青虫放入培养皿中,用简易喷雾器将含0.1% Tween-80的 1.0×10^8 个/mL的金龟子绿僵菌孢子悬浮液均匀地喷在试虫体表,待虫体晾干后,放入装有白菜叶片的培养皿中,以无菌的0.1%吐温-80溶液为对照,每处理重复3次,置于温度22℃、相对湿度90%左右、光周期L//D=14 h//10 h的恒温光照培养箱内。分别于接菌后12、24、36、48、60、72 h取样,备用。

1.5 酶液的制备

试虫先用生理盐水漂洗2~3次,并用滤纸去除体表水分。准确称量试虫重量,按1:9(W/V)加入经过遇冷处理的生理盐水,在冰浴中进行研磨,制成10%组织匀浆液,在4℃下2 500 r/min离心10 min,取上清液作为待测酶液,放入-20℃冰箱内储藏备用。

1.6 酶活性的测定

酶液蛋白含量、SOD、POD和CAT活性测定均按照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书进行。每处理均重复3次,求平均值。

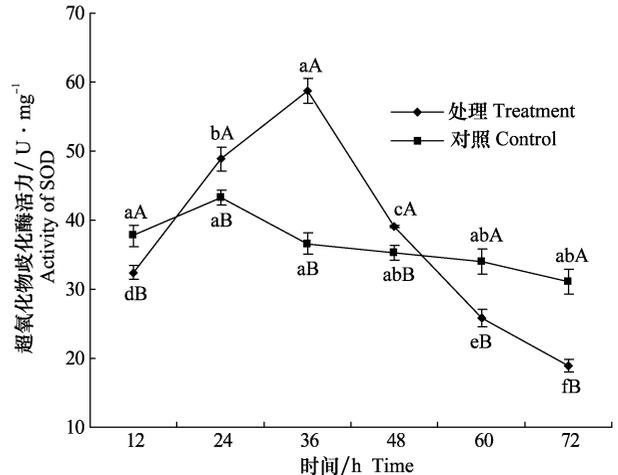
1.7 数据处理

采用 Microsoft Excel 2003 进行数据统计和图表绘制。采用 DPS 7.05 进行方差分析, Duncan 新复极差法比较差异显著性。图中数据用平均值±标准误表示。

2 结果与分析

2.1 菜青虫体内 SOD 活性的变化

经金龟子绿僵菌处理后菜青虫体内 SOD 活性变化如图 1 所示,测定期间对照组菜青虫体内不同时间的 SOD 比活力差异不显著。但处理组不同时间的 SOD 比活力差异极显著($P < 0.01$),在接菌后 12 h 时略低于对照,随后逐渐升高,到 36 h 达到最高峰,显著高于对照组,酶的比活力为同期对照组的 1.6 倍。感染 36 h 之后体内 SOD 活力急剧下降,60 h 及 72 h 显著低于对照组,分别为对照组的 0.83 和 0.60 倍。表明菜青虫被金龟子绿僵菌侵染后 12 h,孢子还未萌发,菌丝未侵入体内,所以表现为 12 h 时处理组与对照组之间差异不显著。而在接菌后 24~36 h, O₂ 浓度增加,导致虫体内的 HO⁻ 浓度大量增加,表现为 SOD 活力明显上升,以减轻过氧离子对虫体的毒害。在感染后期,可能是受金龟子绿僵菌在虫体内大量繁殖的影响,使得 SOD 的合成受到抑制,自身防卫能力下降,表现为 SOD 活力急剧下降并低于正常虫体。



图中数据为平均值±标准误。同一条线上不同小写字母表示各时间点测得的酶活力差异显著($P < 0.05$)。不同大写字母者表示同一时间下处理组与对照组差异显著($P < 0.05$)。下同

The data are mean±SE. The data marked with different lowercase letters on the same line are significantly different ($P < 0.05$). The different capital letters indicate significant difference between treatment and control groups ($P < 0.05$) in the same time. The same below

图1 感染金龟子绿僵菌后4龄菜青虫体内 SOD 活性的变化

Fig. 1 Changes of SOD activities in the 4th instar of *Pieris rapae* larvae infected by *Metarhizium anisopliae*

2.2 菜青虫体内 POD 活性的变化

经金龟子绿僵菌处理后菜青虫体内 POD 活性的变化如图 2 所示,在接菌后 72 h 内,对照组菜青虫体内的 POD 活性无显著变化。而处理组的 POD 活性呈先升高后下降趋势。其中,菜青虫在染菌后 12 h,其体内 POD 比活力与对照组无显著差异;POD 活性在接菌后 24 h 时达到最大,显著高于对照组,为对照组的 1.34 倍;随后缓慢下降,在接菌后 36~48 h,处理组比活力仍显著高于对照组,随后急剧下降,染菌 72 h 后达到最低,显著低于对照组酶活力。说明菜青虫被金龟子绿僵菌侵染后,其体内可能产生具有毒性的氧化物质,从而启动免疫系统合成 POD,以维持其正常的生理功能;但在接菌第 24 h 后,由于金龟子绿僵菌菌丝在菜青虫体内开始萌发,使 POD 合成受到影响,从而表现为 POD 活性逐渐下降。

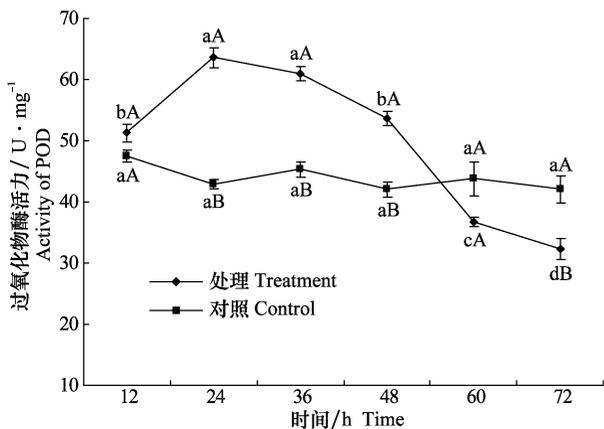


图 2 感染金龟子绿僵菌后 4 龄菜青虫体内 POD 活性的变化

Fig. 2 Changes of POD activities in the 4th instar of *Pieris rapae* larvae infected by *Metarhizium anisopliae*

2.3 菜青虫体内 CAT 活性的变化

经金龟子绿僵菌处理后菜青虫体内 CAT 活性的变化如图 3 所示,对照组菜青虫随着虫体的生长发育 CAT 活性无显著变化。而处理组的 CAT 活性在接菌后变化较大。接菌后 12~24 h,菜青虫 CAT 活性与对照相比,无显著差异。从接菌后 24 h 开始,CAT 活力显著上升,由 20.374 U/mg 上升至 26.798 U/mg,随后缓慢上升至 30.687 U/mg (48 h),达到最高峰,为对照组的 1.55 倍。但在接菌 48 h 后缓慢下降,直至 72 h 时略低于对照,且差异不显著。表明在金龟子绿僵菌侵染初期,菜青虫体内组织暂时未受到侵染,因而

CAT 的活力没有发生明显的变化;而在侵染后期,虫体组织遭受严重侵染,因此菜青虫体内的 CAT 活性提高以抵御病原菌对虫体产生的毒害;但由于金龟子绿僵菌在虫体内的生长繁殖速度很快,最终超出其抵御能力,导致菜青虫的 CAT 活力逐渐下降。

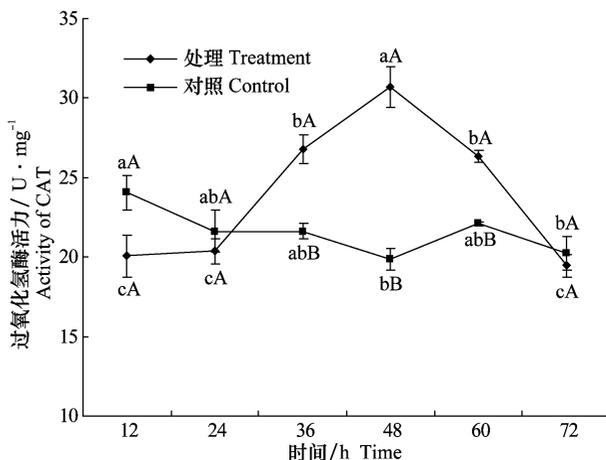


图 3 感染金龟子绿僵菌后 4 龄菜青虫体内 CAT 活性的变化

Fig. 3 Changes of CAT activities in the 4th instar of *Pieris rapae* larvae infected by *Metarhizium anisopliae*

3 讨论

昆虫在遭受一些逆境条件胁迫时,体内正常活性氧平衡系统会遭到一定的破坏,使自由基浓度升高,并导致虫体受到伤害^[12-13]。而昆虫体内的保护酶系统在消除昆虫体内过量的氧自由基方面起到重要的作用。如昆虫体内的 SOD 能清除超氧自由基 (O_2^-) 而形成对机体产生毒害作用的 H_2O_2 , 而 H_2O_2 又可在 POD 和 CAT 的催化下被清除,三者协同作用可使自由基的产生与清除处于一种动态平衡状态,从而维持昆虫体内正常的生理活动^[14]。

本试验结果表明,菜青虫被金龟子绿僵菌侵染后体内的 SOD、POD 和 CAT 酶活性均呈现先升高后降低趋势。这与李会平等^[9]、姬国红等^[15]的报道一致。表明金龟子绿僵菌能有效地干扰菜青虫体内保护酶的活性,出现这种结果,可能是由于菜青虫被金龟子绿僵菌侵染后,其体内产生有毒的氧化物质,从而刺激虫体免疫系统合成相应的保护酶,以抵御有毒物质对虫体的毒害,进而维持昆虫体内正常的生理活动;而随着感染时间的延长,金龟子绿僵菌在虫体内大量繁殖,破坏了虫体组织,菜青虫保护酶的

合成机制受到限制,清除自由基的能力降低,或者是由于感病虫体内自由基过多,自由基产生与清除之间失去平衡,从而引起昆虫发病甚至死亡。从试验结果来看,SOD、POD 和 CAT 活力分别在感染后 36、24 和 48 h 达到最高峰,说明菜青虫体内的保护酶在对金龟子绿僵菌的免疫过程中,首先发生作用的保护酶是 POD,随后为 SOD,而 CAT 是最后发生作用的保护酶。

综上所述,用金龟子绿僵菌侵染菜青虫,能诱导其体内保护酶的活性发生变化,对菜青虫的生物防治具有一定的意义。本文为探明被金龟子绿僵菌感染后菜青虫体内的防御机制提供了一定的理论依据,但是为了更好地研究金龟子绿僵菌对菜青虫的作用机制及菜青虫体内保护酶的作用方式,还需从分子角度对其进行深入探究。

参考文献

- [1] 洪晓月,丁锦华. 农业昆虫学[M]. 第2版. 北京:中国农业出版社,2008:225.
- [2] 蒲蛰龙,李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996.
- [3] Erler F, Ates A O. Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae), as biological control agents against the June beetle [J]. *Journal of Insect Science*, 2015, 15(1):44.
- [4] 林华峰. 虫生真菌研究进展(综述)[J]. 安徽农业大学学报, 2015, 41(1):1-5.
- [20] 方羽生,尹淦鏊. 植物病原线虫短体属种类的研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版),1994(4):32-41.
- [21] Elliot A P, Bird G W. Pathogenicity of *Pratylenchus penetrans* to navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Journal of Nematology*, 1985, 17(2):81-85.
- [22] Dropkin V H. 植物线虫学导论[M]. 潘沧桑,译. 厦门:厦门大学出版社,1992:135-144.
- [23] Webster J M. 经济线虫学[M]. 胡起宇,译. 北京:农业出版社,1988.
- [24] 梅圆圆,郑炜,郑经武. 4种螺旋线虫记述[J]. 植物保护,2008, 34(3):116-118.
- [25] 林丽飞,胡先齐,刘春国,等. 云南省灯盏花根际土壤寄生线虫的种类鉴定[J]. 植物保护,2008,34(3):69-73.
- [26] Porazinska D L, Duncan L W, McSorley R, et al. Nematode communities as indicators of status and processes of a soil eco-

1998, 25(3):251-254.

- [5] 高新菊,沈慧敏. 二斑叶螨对甲氰菊酯的抗性选育及解毒酶活力变化[J]. 昆虫学报,2011, 54(1):64-69.
- [6] 柳小青,刘仰青,熊志伟,等. 氯氰菊酯和残杀威亚致死剂量对致倦库蚊羧酸酯酶活性的影响[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2011,22(4):309-312.
- [7] 马义,霍新北,马民,等. 氯氟菊酯对德国小蠊保护酶活性的影响及新型防治策略研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2009, 20(4):303-306.
- [8] 刘烁安,符悦冠,黄武仁,等. 螺旋粉虱感染蜡蚧轮枝菌对其保护酶和解毒酶活性的影响[J]. 植物保护,2013, 39(3):7-11.
- [9] 李会平,黄大庄,苏筱雨,等. 桑天牛幼虫感染白僵菌后体内主要保护酶活性的变化[J]. 蚕业科学,2007, 33(4):634-636.
- [10] 张仙红,王宏民,李文英,等. 菜青虫感染烟色拟青霉后血淋巴蛋白质含量及几种保护酶活力的变化[J]. 昆虫学报,2006, 49(2):230-234.
- [11] 李周直,沈惠娟,蒋巧根,等. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究[J]. 昆虫学报,1994, 37(4):399-403.
- [12] Arakawa T. Superoxide generative reaction in insect haemolymph and its mimic model system with surfactants *in vitro* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 25(2):247-253.
- [13] Nappi A J, Vass E, Frey F, et al. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites [J]. *European Journal of Cell Biology*, 1995, 68(4):450-456.
- [14] 李毅平,龚和. 昆虫体内抗氧化系统研究进展[J]. 生命科学,1998, 10(5):240-243.
- [15] 姬国红,钱秀娟,刘长仲,等. 夜蛾斯氏线虫对菜青虫几种保护酶活性的影响[J]. 植物保护,2009, 35(4):66-69.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 132 页)

- system influenced by agricultural management practices [J]. *Applied Soil Ecology*, 1999, 13(1):69-86.
- [27] 郑师章,吴千红,王海波. 普通生态学[M]. 上海:复旦大学出版社,1994.
- [28] 陈立杰,段玉玺,梁文举,等. 涕灭威对大豆田土壤线虫生物多样性的影响[J]. 大豆科学,2006, 25(2):164-169.
- [29] Bongers T, van der Meulen H, Korthals G. Inverse relationship between the nematode maturity index and plant parasite index under enriched nutrient conditions [J]. *Applied Soil Ecology*, 1997, 6(2):195-199.
- [30] 刘奇志,边勇,谢文闻,等. 甘肃天水菜园土壤线虫种群结构初探[J]. 北方园艺,2006(5):163-164.
- [31] 刘奇志,边勇,谢文闻,等. 甘肃天水麦田土壤线虫种群结构与土壤健康指数初探[J]. 西北农业学报,2006, 15(2):81-84.

(责任编辑:杨明丽)