

# 苏云金芽胞杆菌JQD117菌株对韭蛆体内几种酶活性的影响

宋健<sup>1</sup>, 曹伟平<sup>1</sup>, 郭庆港<sup>1</sup>, 王猛<sup>2</sup>, 李社增<sup>1</sup>, 杜立新<sup>1\*</sup>

(1. 河北省农林科学院植物保护研究所/河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心/农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室, 保定 071000; 2. 武汉科诺生物科技股份有限公司, 武汉 430074)

**摘要:** 为明确苏云金芽胞杆菌 JQD117 对韭蛆幼虫蛋白酶和解毒酶活性的影响, 测定比较了感染 Bt 后幼虫体内胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、乙酰胆碱酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶和羧酸酯酶的活性。首先采用室内生物活性测定方法明确了菌株 JQD117 对韭蛆 3 龄幼虫 72 h 的  $LC_{50}$  为  $2.8070 \times 10^7$  cfu/mL, 然后采用  $10 \times LC_{50}$ 、 $1 \times LC_{50}$  和  $0.1 \times LC_{50}$  三个浓度饲喂感染韭蛆幼虫, 定期取样测定韭蛆体内 5 种酶活性, 结果表明以较高浓度 ( $1 \times LC_{50}$  和  $10 \times LC_{50}$ ) 感染韭蛆幼虫后体内蛋白酶和解毒酶活性变化较大, 而以低浓度 ( $0.1 \times LC_{50}$ ) 感染韭蛆幼虫后体内蛋白酶活性变化较小。其中, 以  $1 \times LC_{50}$  和  $10 \times LC_{50}$  浓度感染韭蛆幼虫后, 胰蛋白酶和乙酰胆碱酯酶活性在 24~36 h 和 6~60 h 与对照相比均显著升高; 胰凝乳蛋白酶和羧酸酯酶活性在 6~60 h 与对照相比均受到显著抑制。以  $0.1 \times LC_{50}$  浓度感染韭蛆幼虫后, 胰蛋白酶活性只在 36 h 时与对照相比显著升高; 乙酰胆碱酯酶活性在 12~48 h 时与对照相比显著升高; 羧酸酯酶活性只在 6 h 与对照相比受到显著抑制; 胰凝乳蛋白酶活性与对照相比均无显著变化。谷胱甘肽-S-转移酶活性在三种感染浓度下与对照相比均无显著变化。可见, 感染 JQD117 对韭蛆体内蛋白酶和解毒酶活性均产生了不同程度的影响, 且随感染浓度的升高而增强, 扰乱了韭蛆正常的生理代谢和对外源毒素的分解, 本文为 Bt 防治韭蛆应用和开发提供了理论指导。

**关键词:** 苏云金杆菌; 韭菜迟眼蕈蚊; 蛋白酶; 解毒酶

**中图分类号:** S476.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)04-0558-06

## Effect of *Bacillus thuringiensis* JQD117 Strain on Intestinal Protease Activity of Larvae of *Bradysia odoriphaga*

SONG Jian<sup>1</sup>, CAO Weiping<sup>1</sup>, GUO Qinggang<sup>1</sup>, WANG Meng<sup>2</sup>, LI Shezeng<sup>1</sup>, DU Lixin<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences/IPM Center of Hebei Province/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture, Baoding 071000, China; 2. Wuhan Kernel Biotechnology Co., Ltd, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** Effect of *Bacillus thuringiensis* JQD117 strain on activities of protease and detoxification enzymes of *Bradysia odoriphaga* larvae, including trypsin, chymotrypsin, acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST), and carboxylesterase (CarE), were determined. The  $LC_{50}$  of JQD117 strain to *B. odoriphaga* 3<sup>rd</sup> instar larvae at 72 h post treatment was determined to be  $2.8070 \times 10^7$  cfu/mL by laboratory bioactivity assay. Then  $10 \times LC_{50}$ ,  $1 \times LC_{50}$  and  $0.1 \times LC_{50}$  concentrations of JQD117 were used to feed and infect the *B. odoriphaga* 3<sup>rd</sup> instar larvae. Activities of the five enzymes were measured to the samples regularly collected from the population. The results show that, when the *B. odoriphaga* 3<sup>rd</sup> instar larvae were exposed to high concentrations ( $1 \times LC_{50}$  and  $10 \times LC_{50}$ ) of JQD117, enzyme activities varied relatively widely. Among them, when the *B. odoriphaga* 3<sup>rd</sup> instar

收稿日期: 2019-08-23

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0201205); 河北省自然科学基金 (C2018301023); 河北省农林科学院科学技术研究与发展计划项目 (2018120302); 河北重点研发项目 (19226510D); 河北省农村科学院现代农业科技创新工程 (2019-1-03)

作者简介: 宋健, 副研究员, E-mail: sj3250@163.com; \*通信作者, 研究员, E-mail: lxdu2091@163.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.04.016

larvae were infected with  $1 \times LC_{50}$  and  $10 \times LC_{50}$  concentrations of JQD117, trypsin and AchE activities increased significantly at 24–36 h and 6–60 h compared with the control group, while chymotrypsin and CarE activities were significantly inhibited at 6–60 h compared with the control group. When the *B. odoriphaga* 3<sup>rd</sup> instar larvae were infected with  $0.1 \times LC_{50}$  concentrations of JQD117, activities of trypsin and AchE were significantly higher than that of the control group only at 36 h and at 12–48 h, respectively; CarE activity was significantly inhibited only at 6 h compared with that of the control group while no significant change in the activity of chymotrypsin was observed. There was no significant change in GST activity at the three infection concentrations compared with the control. Therefore, infection of JQD117 influences on protease and detoxification enzyme activity in *B. odoriphaga* larvae in a dose-dependent manner. The results provide a theoretical guidance for the application and development of Bt for control of *B. odoriphaga*.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; *Bradysia odoriphaga*; protease; detoxifying enzymes

韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 又名韭蛆, 属双翅目、眼蕈蚊科、迟眼蕈蚊属, 主要为害百合科蔬菜的韭菜、大蒜、大葱和洋葱, 其次为害菊科、藜科、十字花科、葫芦科和伞形科等 30 多种蔬菜<sup>[1,2]</sup>, 广泛分布于我国东北、华北、华中、西北等地, 是我国特有的害虫<sup>[3]</sup>。韭菜迟眼蕈蚊是一种极具破坏性的害虫, 该虫以幼虫群集为害寄主的根、茎, 控制不当, 导致植株死亡和大量减产<sup>[4]</sup>。生产上主要依靠化学农药进行防治, 然而长期施用化学农药导致韭菜农药残留超标, 生态环境的破坏, 甚至危及了人们的身体健康<sup>[5]</sup>。因此, 开发新型高效抗韭蛆杀虫剂及防治技术在我国农业生产、食品安全的战略发展中有着迫切的需求。

河北省农林科学院植物保护研究所前期筛选到一株对韭蛆高毒的苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* JQD117, 在田间能有效防治韭蛆的危害, 具有良好的应用前景, 并获得了国家发明专利 ZL201510165507.7。据报道, 昆虫感染 Bt 后一些解毒酶和蛋白酶的活性变化是影响 Bt 毒性的重要因素<sup>[5-7]</sup>。本研究以韭蛆幼虫为研究对象, 明确感染 Bt 后韭蛆幼虫体内酶活性的变化, 从生理生化的角度研究 Bt 毒素对韭蛆的作用机制。同时为韭蛆的绿色防控及 Bt 杀虫机理提供理论依据, 并为 Bt 产品开发和应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

供试菌株为本试验室自主分离筛选的苏云金芽胞杆菌 JQD117 菌株 (ZL201510165507.7)。

### 1.2 供试昆虫

从河北省保定市郊区韭菜地中采集韭蛆幼虫, 带回试验室, 采用周仙红等<sup>[8]</sup>方法于人工气候室 (宁波东南仪器厂) 进行继代饲养, 取适龄、健康的韭蛆幼虫作为供试虫源。

### 1.3 菌株培养

先将供试菌株在 LB 平板上 30 °C 进行活化培养, 挑取单菌落于 5 mL 液体 LB 培养基中, 30 °C、220 r/min 条件下摇床培养过夜, 按 1% 体积比转接至 50 mL LB 液体摇瓶中培养至胞晶分离, 计数后, 4 °C、8000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 加无菌水重新悬浮菌体, 至 -20 °C 冷冻保藏备用。

### 1.4 生物测定

采用浸叶饲喂法<sup>[9]</sup>, 取备用 Bt 菌悬液  $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^6$  和  $1 \times 10^6$  cfu/mL 7 个浓度, 取 2 mL 菌悬液于 10 mL 灭菌离心管中, 将韭菜茎剪成 2 cm 小段放入菌悬液中浸泡 10 min, 取出放入灭菌的上下均铺有水琼脂和双层滤纸的 90 mm 培养皿中晾干, 每皿接入韭蛆 3 龄幼虫 20 头, 重复 3 次, 设 ddH<sub>2</sub>O 为对照。定期观察死活虫数, 根据 72 h 调查结果, 采用 SPSS 24.0 软件分析计算 LC<sub>50</sub>。

### 1.5 酶源制备

制备 Bt 菌悬液  $10 \times LC_{50}$ 、 $1 \times LC_{50}$ 、 $0.1 \times LC_{50}$  3 个浓度, 采用上述生物测定方法, 每皿接入 200 头 3 龄健康、活泼的韭蛆幼虫, 每处理重复 10 次, 于 (24 ± 1) °C、RH 70% 的生化培养箱中饲养, 分别在 6、12、24、36、48、60 h 定期取样。用 1.5 mL 的离心管分别收集上述饲喂 Bt 和对照的 3 龄韭蛆幼虫各 0.1 g

(约150头);经液氮冷冻后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。待所有试验试虫收集完毕,将离心管取出,分别加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 预冷的 $\text{pH } 7.0$ 的 $0.04\text{ mol/L}$ 磷酸缓冲液中迅速冰浴匀浆;再加入 $900\text{ }\mu\text{L}$ 磷酸缓冲液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $14000\text{ g}$ 离心 $10\text{ min}$ ,取上清液,即为粗提液,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 1.6 酶活性测定

1.6.1 胰蛋白酶活性测定 按照苏州科铭生物技术有限公司胰蛋白酶活性测定试剂盒说明书方法进行。

1.6.2 类胰凝乳蛋白酶活性测定 按照苏州科铭生物技术有限公司类胰凝乳蛋白酶活性测定试剂盒说明书方法进行。

1.6.3 乙酰胆碱酯酶活性测定 按照苏州科铭生物技术有限公司乙酰胆碱酯酶活性测定试剂盒说明书方法进行。

1.6.4 谷胱甘肽-S-转移酶活性测定 按照苏州科铭生物技术有限公司谷胱甘肽-S-转移酶活性测定试剂盒说明书方法进行。

1.6.5 羧酸酯酶活性测定 按照苏州科铭生物技术有限公司羧酸酯酶活性测定试剂盒说明书方法进行。

## 1.7 数据统计与分析

试验数据采用SPSS 24.0软件进行统计分析,采用Duncan's新复极差法进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 Bt菌株JQD117对韭蛆3龄幼虫的活性测定

采用浸叶饲喂法,测定了Bt菌株对韭蛆3龄幼虫的杀虫活性,确定了Bt菌株对韭蛆3龄幼虫72h的 $\text{LC}_{50}$ 为 $2.8070\times 10^7\text{ cfu/mL}$ ,根据此结果配制 $10\times\text{LC}_{50}$ 、 $1\times\text{LC}_{50}$ 、 $0.1\times\text{LC}_{50}$ 3个浓度,进行下一步酶活性测定。

### 2.2 感染Bt菌株JQD117对韭蛆幼虫胰蛋白酶活性的影响

韭蛆幼虫感染JQD117后,随着感染时间的延长,其体内胰蛋白酶活性均不同程度地升高。以 $0.1\times\text{LC}_{50}$ 浓度感染韭蛆幼虫后,胰蛋白酶活性大部分时间与对照相比无显著差异( $P>0.5$ ),只在36h时与对照相比显著升高( $P<0.01$ );而以 $1\times\text{LC}_{50}$ 和 $10\times\text{LC}_{50}$ 浓度感染韭蛆幼虫后,胰蛋白酶活性在24和36h时分别为6.28、6.30 U/g和7.66、7.52 U/g,与对照相比均显著升高( $P<0.01$ ),而感染6和12h时,胰蛋白酶活性与对照相比无显著变化,感染48~60h时,胰蛋白酶活性回落至正常水平,与对照相比无显著差异( $P>0.5$ )。不同浓度Bt JQD117感染韭蛆幼虫后,在感染24和36h时胰蛋白酶活性与对照相比显著升高,且随感染浓度的升高而增强(表1)。

### 2.3 感染Bt菌株JQD117对韭蛆幼虫类胰凝乳蛋白酶活性的影响

韭蛆幼虫经JQD117感染后,随处理时间的延长,类胰凝乳蛋白酶活性均受到不同程度的抑制。以 $0.1\times\text{LC}_{50}$ 浓度感染韭蛆幼虫后,类胰凝乳蛋白酶活性稍有降低,但与对照相比无显著差异( $P>0.5$ );而以 $1\times\text{LC}_{50}$ 和 $10\times\text{LC}_{50}$ 浓度感染韭蛆幼虫后,在6、12、24、48和60h,类胰凝乳蛋白酶活性均受到抑制,与对照相比差异显著( $P<0.05$ )。类胰凝乳蛋白酶活性受到不同程度抑制,且随着感染浓度的升高而增强(表2)。

### 2.4 Bt菌株JQD117对韭蛆幼虫乙酰胆碱酯酶活性的影响

韭蛆幼虫经JQD117感染后,随着感染时间的延长,乙酰胆碱酯酶活性均不同程度升高。以 $0.1\times\text{LC}_{50}$ 浓度感染韭蛆幼虫后,在12~48h,乙酰胆碱酯酶活性与对照相比均显著升高( $P<0.01$ );而以 $1\times\text{LC}_{50}$ 和 $10\times\text{LC}_{50}$ 浓度感染韭蛆幼虫后,在6~60h,乙酰胆碱酯酶活性与对照相比均显著升高( $P<0.01$ )。乙酰胆碱酯酶在感染后的酶活性与对照相比显著升高,且随感染浓度升高而增强(表3)。

### 2.5 Bt菌株JQD117对韭蛆幼虫谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响

菌株JQD117感染韭蛆幼虫后,随着时间的延长,谷胱甘肽-S-转移酶活性与对照相比略有降低,但在各感染浓度和不同时间下,谷胱甘肽-S-转移酶活性与对照相比均无显著差异( $P>0.05$ )(表4)。

### 2.6 Bt菌株JQD117对韭蛆幼虫羧酸酯酶活性的影响

菌株JQD117感染韭蛆幼虫后,随着时间的延长,羧酸酯酶活性受到不同程度抑制。其中以 $0.1\times\text{LC}_{50}$

浓度感染韭蛆幼虫后, 仅在 6 h 时, 羧酸酯酶活性与对照相比受到显著抑制 ( $P < 0.01$ ), 其他时间段与对照相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 而以  $1 \times LC_{50}$  和  $10 \times LC_{50}$  浓度感染韭蛆幼虫后, 在 6~60 h, 羧酸酯酶活性与对照相比均受到显著抑制 ( $P < 0.05$ )。羧酸酯酶活性与对照相比大部分时间均受到抑制, 且随感染浓度升高而增强 (表 5)。

表 1 不同浓度 JQD117 对韭蛆幼虫胰蛋白酶活性的影响 (U/g)

Table 1 Effects of different concentrations of JQD117 on trypsin activity of *B. odoriphaga* larvae (U/g)

处理 Treatment	时间 Time (h)					
	6	12	24	36	48	60
$10 \times LC_{50}$	3.29±0.75 a	3.89±1.31 a	7.66±0.74 b	7.52±0.69 c	5.04±1.18 a	4.72±0.84 a
$1 \times LC_{50}$	3.46±0.78 a	3.84±0.55 a	6.28±0.66 b	6.30±0.62 bc	5.17±0.94 a	4.77±0.81 a
$0.1 \times LC_{50}$	3.52±0.74 a	3.88±0.56 a	4.07±0.57 a	4.95±0.57 b	4.15±0.91 a	4.79±0.69 a
CK	2.26±0.57 a	2.78±0.46 a	3.00±0.28 a	2.26±0.68 a	3.63±0.46 a	3.47±0.67 a

注: 表中数据为平均值±标准误, 同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检测在 5%水平上差异显著。

Note: Data were mean±SE, data in a column with the different lowercase letters are significantly different at 0.05 level using Duncan's range test.

表 2 不同浓度 JQD117 对韭蛆幼虫类胰凝乳蛋白酶活性的影响 (U/g)

Table 2 Effects of different concentrations of JQD117 on Chymotrypsin activity of *B. odoriphaga* larvae (U/g)

处理 Treatment	时间 Time (h)					
	6	12	24	36	48	60
$10 \times LC_{50}$	12.74±0.78 b	13.28±0.76 b	15.46±0.59 c	16.90±0.83 a	16.86±0.72 bc	17.52±0.64 b
$1 \times LC_{50}$	14.30±0.72 b	13.94±0.55 b	16.26±0.54 bc	16.30±0.65 a	15.52±0.73 c	19.40±0.50 ab
$0.1 \times LC_{50}$	16.93±0.87 a	17.85±0.78 a	17.52±0.63 ab	16.32±0.56 a	18.45±0.55 ab	20.55±0.71 a
CK	18.30±0.67 a	18.99±1.04 a	18.56±0.60 a	16.48±0.62 a	19.35±0.49 a	20.34±0.61 a

注: 表中数据为平均值±标准误, 同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检测在 5%水平上差异显著。

Note: Data were mean±SE, data in a column with the different lowercase letters are significantly different at 0.05 level using Duncan's range test.

表 3 不同浓度 JQD117 对韭蛆幼虫乙酰胆碱酯酶活性的影响 ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )Table 3 Effects of different concentrations of JQD117 on AchE activity of *B. odoriphaga* larvae ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )

处理 Treatment	时间 Time (h)					
	6	12	24	36	48	60
$10 \times LC_{50}$	29.40±0.55 a	64.93±2.41 c	89.43±1.55 d	68.00±1.53 c	52.90±1.08 b	41.30±1.13 b
$1 \times LC_{50}$	36.70±1.16 b	58.40±1.54 b	72.08±1.73 c	66.15±1.13 bc	52.33±1.28 b	40.30±0.63 b
$0.1 \times LC_{50}$	27.28±0.99 a	58.40±1.99 b	66.80±1.54 b	63.70±1.18 b	52.33±1.24 b	35.12±0.83 a
CK	29.85±0.66 a	36.75±1.12 a	38.60±1.46 a	37.20±0.96 a	32.30±1.12 a	34.53±0.71 a

注: 表中数据为平均值±标准误, 同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检测在 5%水平上差异显著。

Note: Data were mean±SE, data in a column with the different lowercase letters are significantly different at 0.05 level using Duncan's range test.

表 4 不同浓度 JQD117 对韭蛆幼虫谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响 ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )Table 4 Effects of different concentrations of JQD117 on GST activity of *B. odoriphaga* larvae ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )

处理 Treatment	时间 Time (h)					
	6	12	24	36	48	60
$10 \times LC_{50}$	17.17±0.64 a	13.84±1.71 a	14.24±1.60 a	15.10±1.20 a	16.36±0.49 a	17.08±0.52 a
$1 \times LC_{50}$	17.02±0.96 a	14.97±0.39 a	16.48±0.74 a	16.99±0.73 a	17.06±0.74 a	18.14±0.55 a
$0.1 \times LC_{50}$	15.94±0.87 a	15.72±0.63 a	16.43±0.42 a	16.68±0.69 a	17.03±0.82 a	19.67±0.66 a
CK	17.78±1.27 a	17.62±1.10 a	16.18±0.28 a	17.92±1.00 a	17.72±1.32 a	17.94±1.38 a

注: 表中数据为平均值±标准误, 同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检测在 5%水平上差异显著。

Note: Data were mean±SE, data in a column with the different lowercase letters are significantly different at 0.05 level using Duncan's range test.

表 5 不同浓度 JQD117 对韭蛆幼虫羧酸酯酶活性的影响 (U/g)  
Table 5 Effects of different concentrations of JQD117 on CarE activity of *B. odoriphaga* larvae (U/g)

处理 Treatment	时间 Time (h)					
	6	12	24	36	48	60
10×LC <sub>50</sub>	29.01±0.48 c	27.03±0.26 c	28.72±0.55 c	29.79±0.62 c	34.52±0.65 a	34.38±0.46 b
1×LC <sub>50</sub>	31.94±1.00 b	31.80±0.61 b	32.32±0.57 b	32.45±0.69 b	32.22±0.57 b	33.56±0.67 b
0.1×LC <sub>50</sub>	35.52±0.34 a	36.61±0.43 a	35.48±0.89 ab	35.47±0.48 a	34.18±0.63 a	34.84±0.64 ab
CK	36.87±0.57 a	36.86±0.55 a	34.22±0.46 a	35.24±0.46 a	34.70±0.36 a	36.81±0.42 a

注: 表中数据为平均值±标准误, 同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检测在 5%水平上差异显著。

Note: Data were mean±SE, data in a column with the different lowercase letters are significantly different at 0.05 level using Duncan's range test.

### 3 讨论

苏云金芽胞杆菌的主要活性成分是杀虫晶体蛋白, 这种杀虫晶体蛋白只有在昆虫肠道被肠道蛋白酶水解活化成毒蛋白, 才能对昆虫起到毒杀活性, 可见昆虫肠道蛋白酶与 Bt 杀虫晶体蛋白毒性密切相关<sup>[10]</sup>。Oppert 等<sup>[11]</sup>认为丝氨酸蛋白酶类是 Bt 杀虫晶体蛋白的主要消化酶。张少燕等<sup>[12]</sup>对棉铃虫幼虫的研究发现类胰凝乳蛋白酶的活性随 Bt 杀虫晶体蛋白浓度增大而显著升高。从本文结果上看, 感染不同浓度 JQD117 后韭蛆幼虫体内胰蛋白酶活性在 36 h 时与对照相比均显著升高, 而高浓度 1×LC<sub>50</sub> 和 10×LC<sub>50</sub> 感染韭蛆幼虫后, 胰蛋白酶活性在 24 h 时与对照相比也显著升高; 而类胰凝乳蛋白酶活性受到不同程度抑制, 0.1×LC<sub>50</sub> 浓度感染韭蛆幼虫后, 类胰凝乳蛋白酶活性与对照相比无显著差异; 而以 1×LC<sub>50</sub> 和 10×LC<sub>50</sub> 浓度感染韭蛆幼虫后, 在 6、12、24、48、60 h, 类胰凝乳蛋白酶活性与对照相比均受到显著抑制, 由此可以推测, 在韭蛆幼虫体内, 对 Bt 杀虫晶体蛋白活化起主要作用的可能是胰蛋白酶, 胰蛋白酶活性随感染浓度的升高而增强, 可以使更多的 Bt 杀虫晶体蛋白转化为毒蛋白, 从而提高其杀虫毒性, 而类胰凝乳蛋白酶活性受到抑制, 减少了其对毒蛋白的过度降解, 为毒蛋白发挥作用提供了有利的条件。解娜等<sup>[13]</sup>和徐艳聆等<sup>[14]</sup>也发现黏虫 *Mythimna separate* (Walker) 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 取食 Bt 毒蛋白后, 类胰凝乳蛋白酶活性较对照明显受到抑制, 与本文结果一致; 而赵爱萍等<sup>[15]</sup>发现取食转 Bt 毒蛋白后小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus) 幼虫体内胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性均明显升高, 且随浓度升高呈上升趋势; 与本文结果存在差异, 这可能与 Bt 杀虫晶体蛋白种类、感染浓度和昆虫种类有关。

研究表明昆虫在受到外源物或者杀虫剂的侵染时, 可通过改变其体内解毒酶的活性对昆虫体内的外源毒物进行分解, 从而维持正常生理代谢<sup>[13,14,16]</sup>, 若解毒酶系受到影响, 可延长外源有害物质在体内存留时间及在体内的运输, 并发挥其毒效<sup>[17,18]</sup>。乙酰胆碱酯酶是神经突触部位清除乙酰胆碱, 维护神经正常传导的重要酶类, 其活力是衡量昆虫神经生理活力的重要指标<sup>[19]</sup>。本研究结果显示, 乙酰胆碱酯酶活力在感染 JQD117 后, 虫体产生应激反应, 酶活性显著增高, 且随感染浓度的升高而增加, 说明 JQD117 引起了乙酰胆碱酯酶对外源有毒物质的防御反应。羧酸酯酶是昆虫对杀虫剂代谢最重要的酶系之一, 也是杀虫剂代谢中唯一不需要额外能量就能够催化酯类化合物水解的一类酶系<sup>[20,21]</sup>。本研究结果发现, 韭蛆幼虫感染 JQD117 后, 体内羧酸酯酶活性均受到不同程度的抑制, 且随感染浓度升高而增强, 说明 JQD117 抑制了羧酸酯酶对体内有害物质的代谢, 不利于韭蛆幼虫体内有害物质的排出。昆虫谷胱甘肽-S-转移酶能催化内源还原性谷胱甘肽 (GSH) 与各种有害的亲电性底物相结合, 增加后者的可溶性, 从而有利于其从细胞内排出, 进而保护生物体内的核酸蛋白质免受亲电基团攻击<sup>[22]</sup>。本研究结果发现, 韭蛆幼虫感染 JQD117 后, 在各感染浓度和感染时间, 谷胱甘肽 S-转移酶活性与对照相比均无显著差异。可见, JQD117 对谷胱甘肽 S-转移酶活性影响不大。肖海兵等<sup>[23]</sup>也发现, 米蛾幼虫取食转 SCK/CryI Ac 毒蛋白质基因稻谷后, 体内的乙酰胆碱酯酶活力显著高于对照, 谷胱甘肽转移酶活性与对照组相比无显著差异。由此可见, Bt 杀虫晶体蛋白侵入昆虫体内后, 各种解毒酶活性受到不同程度的影响, 这种活性的增高或抑制与毒蛋白对中肠组织的破坏及对细胞正常能量代谢的干扰作用有关, 同时因 Bt 毒蛋白种类的不同和靶标昆虫种类的不同, 蛋白酶活性的变化也大不相同, 因此, Bt 对靶标昆虫体内酶活性影响的动态机制尚需深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Li W X, Yang Y T, Xie W, *et al.* Effects of temperature on the age-stage, two-sex life table of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae)[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2015, 108: 126-134.
- [2] Yang Y T, Li W X, Xie W, *et al.* Development of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) as affected by humidity: an age-stage, two-sex, life-table study[J]. *Applied Entomology and Zoology*, 2015, 50: 3-10.
- [3] 张友军, 吴青君, 王少丽, 等. 我国蔬菜重要害虫研究现状与展望[J]. *植物保护*, 2013, 39(5): 38-45.
- [4] Shi C H, Yang F S, Zhu X, *et al.* Evaluation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR analysis of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17: 1034-1052.
- [5] 张鹏, 陈澄宇, 李慧, 等. 七种新烟碱类杀虫剂对韭菜迟眼蕈蚊幼虫及蚯蚓的选择毒性[J]. *植物保护学报*, 2014, 41(1): 79-86.
- [6] Gunning R V, Dang H T, Kemp F C, *et al.* New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 2558-2563.
- [7] Yang Y H, Yang Y J, Gao W Y, *et al.* Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible *Helicoverpa armigera* to obtain resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac[J]. *Bulletin of Entomology Research*, 2009, 99: 175-181.
- [8] 周仙红, 张思聪, 庄乾营, 等. 韭蛆人工饲料配方筛选及饲养效果比较[J]. *昆虫学报*, 2015, 58(11): 1245-1252.
- [9] 慕卫, 丁中, 何茂华, 等. 韭菜迟眼蕈蚊的生测方法及防治药剂研究[J]. *华北农学报*, 2002, 17(S1): 12-16.
- [10] 谭树乾, 尹姣, 李克斌, 等. Cry8Gal 蛋白对华北大黑鳃金龟幼虫主要酶活性的影响[J]. *植物保护*, 2013, 39(3): 1-6.
- [11] Oppert B, Kramer K J, Johnson D, *et al.* Luminal proteases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac protoxin[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 26: 571-583.
- [12] 张少燕, 李典谟, 谢宝瑜. Bt 毒蛋白对棉铃虫的生长发育和相关酶活性的影响[J]. *昆虫知识*, 2004, 41(6): 536-540.
- [13] 解娜, 江幸福, 罗礼智, 等. Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫中肠几种酶活性的影响[J]. *昆虫学报*, 2012, 55(2): 168-175.
- [14] 徐艳玲, 王振营, 何康来, 等. 转 Bt 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟幼虫几种主要酶系活性的影响[J]. *昆虫学报*, 2006, 49(4): 562-567.
- [15] 赵爱平, 展恩玲, 孙聪, 等. Cry1Ac 毒素对小菜蛾幼虫中肠蛋白酶和羧酸酯酶活性的影响[J]. *植物保护学报*, 2017, 44(5): 713-720.
- [16] 李飞, 韩召军, 吴智锋. 取食不同寄主棉蚜的羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶特比较[J]. *南京农业大学学报*, 2002, 25(2): 57-60.
- [17] 刘泽文, 韩召军, 张玲春, 等. 解毒酶系在褐飞虱对马拉硫磷的抗性发展中的作用[J]. *南京农业大学学报*, 2003, 26(1): 24-28.
- [18] 高新菊, 张志刚, 段辛乐, 等. 二斑叶螨抗四螨嗪品系筛选及其解毒酶活力变化[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(7): 1432-1438.
- [19] Head G, Brown C R, Groth M E. CryIAb protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: Implications for secondary exposure risk assessment[J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1999, 99: 37-45.
- [20] 高希武, 赵颖, 王旭, 等. 杀虫药剂和植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用[J]. *昆虫学报*, 1998(S1): 7-13.
- [21] Mastumura F. Metabolism of insecticides by animals and plants[M]//Mastumura F. *Toxicology of Insecticides*, 2nd ed. New York: Plenum Press, 1985, 203-298.
- [22] 豆威, 王进军. 昆虫谷胱甘肽 S-转移酶研究进展[C]//农业生物灾害预防与控制研究. 北京, 2005, 426-431.
- [23] 肖海兵, 刘映红, 刘旭, 等. 转 sck/cry1Ac 基因稻谷对米蛾幼虫解毒酶系的影响[J]. *植物保护*, 2012, 38(4): 21-26.