

抗性选育对小菜蛾体内解毒酶和消化酶活性的影响

杨柳¹, 刘双清¹, 龚莉君¹, 张慧超², 谭济才¹, 黄松青³, 杨中侠^{1*}

(1.湖南农业大学生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.天津市蓟县林业局, 天津 301900; 3.长沙市烟草公司宁乡县分公司, 湖南 宁乡 410600)

摘 要: 测定小菜蛾 Cry1Ac 抗性品系(Cry1Ac-R)、Cry1Ac 敏感品系(Cry1Ac-S)3 种解毒酶的活性。结果表明, 小菜蛾抗性品系的谷胱甘肽转移酶活性高于敏感品系; 敏感品系的羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的活性高于抗性品系, 但 2 品系的解毒酶活性无显著差异。测定小菜蛾 Cry1Ac 抗性品系、敏感品系及 *Bt* 抗性品系(*Bt*-T2)消化酶活性, 结果小菜蛾敏感品系海藻糖酶、蔗糖酶活性均最高, *Bt* 抗性品系最低, 但各品系的 2 种消化酶活性之间差异不显著; 小菜蛾敏感品系蛋白酶活性最高, 抗性品系最低, 各品系的蛋白酶活性差异极显著。

关 键 词: 小菜蛾; 抗性选育; 解毒酶; 消化酶

中图分类号: S436.341.2⁺4

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)05-0529-05

Effect of resistance selection on activities of detoxification enzymes and digestive enzymes in *Plutella xylostella*

YANG Liu¹, LIU Shuang-qing¹, GONG Li-jun¹, ZHANG Hui-chao², TAN Ji-Cai¹, HUANG Song-qing³, YANG Zhong-xia^{1*}

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Jixian Forestry Bureau of Tianjin City, Jixian, Tianjin 301900, China; 3.Branch Company of Ningxiang County of Changsha City Tobacco Company, Ningxiang, Hunan 410600, China)

Abstract: The activities of gultathione S transferases (GSTs), carboxylesterase (CarE) and Acetylcholinesterase (AChE) in laboratory strains of the *Plutella xylostella* have been examined. The result shows that the activity of GSTs of the resistant strain(Cry1Ac-R), Cry1Ac is higher than that of the susceptible strain(Cry1Ac-S). The activities of Care and AChE of the susceptible strain are higher than that of the resistant strain, but there is no obvious difference of detoxification enzymes activity between the two strains. The activities of digestive enzyme of the resistant strain,(Cry1Ac) the susceptible strain and the *Bt* resistant strain (*Bt*-T2) have also been examined. The activities of trehalase and sucrase of the susceptible strain are the highest, those of the *Bt* resistant strain are the lowest, but there is no obvious difference between the two strains in the two digestive enzymes. Protease activity of the susceptible strain of the *Plutella xylostella* is the highest, while the protease activity of its resistant strain is the lowest, and the difference of protease activity between these strains is very obvious.

Key words: *Plutella xylostella*; resistance breeding; detoxification enzymes; digestive enzymes

小菜蛾(*Plutella xylostella*)已对包括苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)在内的几乎所有类型的杀虫剂都产生了抗药性^[1-5]。有研究表明, 对昆虫

分解外源毒物、维持正常生理代谢起重要作用的几种解毒酶, 如羧酸酯酶(CarE)、乙酰胆碱酯酶(AChE)和谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)等活性的改变, 可反

收稿日期: 2013-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171861); 国家自然科学基金青年基金项目(30900948); 湖南省高等学校科学研究青年项目(12B065); 湖南农业大学 2012 年大学生科技创新基金项目(XCX12044)

作者简介: 杨柳(1983—), 男, 湖南宁乡人, 博士研究生, 主要从事昆虫生态学研究, *通信作者, yzxmichelle@aliyun.com

映昆虫对诸多化学药剂的抗性^[6-7]:乙酰胆碱酯酶变构及神经敏感度降低,谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活性增高。

笔者对美国康奈尔大学惠赠及采自深圳的小菜蛾田间种群分别用 Cry1Ac 及 *Bt* 毒素进行抗性选育,比较经 Cry1Ac 毒素汰选后,小菜蛾幼虫体内 3 种解毒酶活性, Cry1Ac 毒素及 *Bt* 汰选后海藻糖酶、蔗糖酶及蛋白酶活性的变化,以了解抗性选育后小菜蛾的生理生化特性。

1 材料与方法

1.1 供试虫源与寄主植物^[8]

小菜蛾敏感品系(Cry1Ac-S),于室内饲养多年,期间从未使用过任何杀虫剂;小菜蛾抗性品系(Cry1Ac-R),2003 年由康奈尔大学赵建周惠赠,后于室内以 Cry1Ac 毒素汰选,抗性倍数已达 797.80 倍;小菜蛾 *Bt* 抗性品系(*Bt*-T2),2003 年采自深圳田间,后于室内以 *Bt* 毒素汰选,抗性倍数为 3.96 倍。寄主植物为京丰一号甘蓝。

1.2 方 法

1.2.1 解毒酶活性的测定

1) 谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)活性测定。参照文献[9]和 [10]的方法并加以改进。每处理取 5 头 4 龄小菜蛾幼虫,置于 300 μ L 0.05 mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液中,冰浴匀浆。取上清液 100 μ L,与 1.2 mmol/L CDNB 100 μ L 和 12 mmol/L GSH 100 μ L 混匀置入酶标板中。对照为 100 μ L 0.05 mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液替代酶源参加反应。反应 5 min,每处理 8 次重复。

2) 羧酸酯酶(CarE)活性测定。参照文献[11]和 [12]方法并加以改进。每处理取 5 头 4 龄小菜蛾幼虫,置于 500 μ L 混有 1 g/L Triton X-100 的 0.2 mol/L pH6.0 PBS 缓冲液中冰浴匀浆,取 25 μ L 上清酶源与 25 μ L 0.2 mol/L pH6.0 PBS 加入酶标孔,再加入 200 μ L 6 g/L 的固蓝 RR 盐和 1 mmol/L α -NA 的混合液,反应 15 min,每处理 8 次重复。

3) 乙酰胆碱酯酶(AChE)活性测定。参照文献[13]的方法并加以改进。每处理取 4 龄小菜蛾幼虫 5

头置于 500 μ L 混有 1 g/L Triton X-100 的 0.1 mol/L pH 7.5 的 PBS 中,冰浴匀浆,取 50 μ L 上清加入 96 孔板孔,后每孔加 200 μ L 0.75 mol/L ATChI 和 0.075 mmol/L DTNB 的混合液。反应 20 min,每处理 8 次重复。

蛋白质浓度以牛血清蛋白为标准品,采用北京博迈德科技发展有限公司 Bradford 蛋白定量试剂盒进行测定。

1.2.2 消化酶活性测定

海藻糖和蔗糖酶活性测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS),蛋白酶活力采用福林酚试剂法^[14],并略加改进。

1) 海藻糖酶和蔗糖酶活性测定。取 5 头 4 龄小菜蛾幼虫,于 1 mL 0.02 mol/L pH7.0 PBS 液中冰浴匀浆,取上清作为酶源,以 1 mg/mL 葡萄糖标准溶液作标准曲线。取 0.1 mL 酶液加 0.9 mL 0.02 mol/L pH 7.0 PBS 缓冲液,1 mL 4%蔗糖溶液于 40 $^{\circ}$ C 水浴 60 min,后加入 1 mL 1 mol/L 氢氧化钠,1 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂沸水浴 5 min,冷却,加入 1 mL 蒸馏水至 5 mL 混匀,550 nm 测定吸光值,计算蔗糖酶的活性。取 0.1 mL 酶液加 0.9 mL 0.02 mol/L pH 5.8 PBS 缓冲液,0.5 mL 3%淀粉溶液于 40 $^{\circ}$ C 水浴 60 min,后加入 1 mL 1 mol/L 氢氧化钠,1 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂沸水浴 5 min,冷却,加入 1.5 mL 蒸馏水至 5 mL 混匀,550 nm 测定吸光值,计算海藻糖酶的活性。

2) 蛋白酶活性测定。取 5 头 4 龄小菜蛾幼虫,于 1.5 mL 离心管中,加入 0.6 mL 生理盐水,冰浴匀浆,取上清作为酶源,以 1 mg/mL 酪氨酸作标准曲线。取 0.1 mL 酶液加 0.25 mL 0.02 mol/L pH 6.5 PBS 缓冲液于 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h,后加入 1 mL 20%TCA,14 000 转 r/min 离心 10 min,取 0.4 mL 上清加入 2 mL 0.5 mol/L 碳酸钠,0.4 mL 福林酚试剂混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 20 min,660 nm 测定吸光值,计算蛋白酶的活性。

1.2.3 数据处理

采用 SPSS 10.0 软件对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 抗性选育对小菜蛾解毒酶活性的影响

小菜蛾 Cry1Ac-R 品系 GSTs 活性为 Cry1Ac-S 品系的 1.18 倍,小菜蛾 Cry1Ac-S 品系 CarE 和 AChE 活性均高于 Cry1Ac-R 品系。小菜蛾敏感品系的 3 种解毒酶活性与抗性品系相比均无显著差异(图 1)。

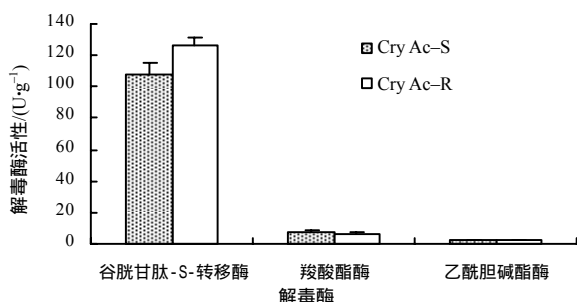


图1 Cry1Ac毒素抗性选育下的小菜蛾解毒酶活性

Fig.1 Effects of Cry1Ac toxin on the detoxifying enzyme activities in *Plutella xylostella*

2.2 抗性选育对小菜蛾消化酶活性的影响

小菜蛾 Cry1Ac-S 品系海藻糖酶、蔗糖酶活性均为最高,其次为 Cry1Ac-R 品系, Bt-T2 品系最低, 3 品系的 2 种消化酶活性之间差异不显著。小菜蛾 Cry1Ac-S 品系蛋白酶活性最高,其次为 Bt-T2 品系, Cry1Ac-R 品系为最低, Cry1Ac-S 品系蛋白酶活性与其他 2 个品系的差异均达极显著水平(图 2)。

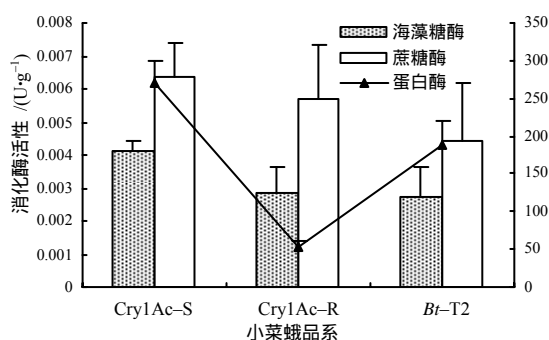


图2 不同药剂抗性选育下小菜蛾的消化酶活性

Fig.2 Digestive enzymes activity in *P. xylostella* populations selected by different insecticides

3 讨论

昆虫体内解毒酶活力的增强是昆虫产生抗药性的主因^[15]。酯酶在昆虫体内含量丰富,是一类能水解酯键,并参与拟除虫菊酯类解毒代谢的酶类。谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)、羧酸酯酶(CarE)和乙酰

胆碱酯酶(AChE)是昆虫体内 3 种重要的代谢和解毒酶,对杀虫剂在体内的代谢具有重要作用^[16-17]。

有研究^[18]表明,经过不同药剂汰选后,抗性品系与敏感品系小菜蛾的 GSTs 活性有明显差异,有机磷杀虫剂汰选的抗性小菜蛾, GSTs 活力明显高于敏感小菜蛾,而阿维菌素和高效氯氰菊酯的亚致死剂量处理小菜蛾后,敏感品系的 GSTs 活性提高,抗性品系的降低^[19]。本研究发现,小菜蛾经 Cry1Ac 毒素选育后,抗性小菜蛾 GSTs 活性明显高于敏感品系,为其 1.18 倍,说明 Cry1Ac 毒素进入小菜蛾体内后, GSTs 的活性明显提高。

CarE 主要通过代谢体内某些内源及外来有害物质使其分解,排出体外,从而达到解毒的目的。侯军等^[20]发现,鬼臼毒素对小菜蛾幼虫体内羧酸酯酶表现为先激活、24 h 后抑制的作用。李腾武等^[21]的试验表明,阿维菌素对小菜蛾抗性选育后,羧酸酯酶的活性呈现出先减少,汰选 22 代以后增加的趋势。本研究发现, Cry1Ac 毒素汰选后,小菜蛾幼虫体内 CarE 活性低于对照,但无显著差异。这在一定程度上说明 CarE 的作用可能不是小菜蛾幼虫分解 Cry1Ac 毒素的主因。

AChE 在神经传递过程中执行重要的生理功能,杀虫剂通过抑制昆虫体内的 AChE,影响突触部位神经冲动传导而导致昆虫死亡。李腾武等^[21]发现,阿维菌素抗性选育对小菜蛾幼虫体内的 AChE 活性无显著影响。本研究结果表明, Cry1Ac 毒素汰选小菜蛾后, AChE 活性低于对照,但无显著差异。这在一定程度上说明 AChE 的作用可能也不是小菜蛾幼虫分解 Cry1Ac 毒素毒害的主因。

海藻糖酶、蔗糖酶和蛋白酶是昆虫体内能量合成及消化必需的 3 种酶^[22-23]。有研究发现,注射海藻糖酶抑制剂至昆虫体内,可引起昆虫死亡或影响其发育和运动^[24]。本研究发现, Cry1Ac 毒素及 Bt 制剂汰选后,小菜蛾体内海藻糖酶的活性均低于对照,说明药剂汰选对昆虫体内碳水化合物及其能量代谢产生了一定的影响; Bt-T2 品系海藻糖酶的活性低于 Cry1Ac-R 品系的,表明 Bt 制剂汰选对小菜蛾昆虫碳水化合物及其能量代谢的影响大于 Cry1Ac 毒素汰选。

蔗糖酶不仅分解蔗糖提供能量,还对昆虫体内

的渗透压起调节作用,以应对植物韧皮部汁液的高渗透压^[25]。Cry1Ac 毒素及 *Bt* 制剂汰选后小菜蛾体内蔗糖酶的活性均低于对照,说明药剂汰选对昆虫体内的能量合成具有抑制作用。

有研究表明,某些昆虫对 *Bt* 低度敏感的主要原因是中肠液蛋白水解能力过高而导致原毒素过度降解^[26-27]。李秀岚等^[28]发现,红蓼拒食活性组分对小菜蛾幼虫体内的蛋白酶、脂肪酶和 α -淀粉酶的活性具有一定的抑制作用。本试验研究表明,Cry1Ac 毒素及 *Bt* 制剂汰选后,小菜蛾体内蛋白酶的活性降低,与已有的肠液对原毒素活化能力的降低与昆虫抗性的形成有关^[29-30]的结果一致。2 个抗性品系与敏感品系间蛋白酶活性差异极显著,Cry1Ac 抗性品系小菜蛾幼虫体内的蛋白酶活性远低于 *Bt* 抗性品系。

由以上结果推测,Cry1Ac 毒素汰选后,小菜蛾可能通过不同强度的解毒酶活性来实现对药剂的适应,表现出较高的 GSTs 活性及较低的 CarE 与 AChE 活性,这可能是由于小菜蛾受毒素的影响,其体内解毒酶活性有较大的变化;抗性品系与对照的 3 种解毒酶活性之间无显著差异,在一定程度上说明 GSTs、CarE 与 AChE 的作用可能不是小菜蛾幼虫分解 Cry1Ac 毒素毒害的主因。Cry1Ac 毒素和 *Bt* 汰选后,小菜蛾体内海藻糖酶、蔗糖酶和蛋白酶活性降低,可能是受毒素中有效成分的影响,使小菜蛾 Cry1Ac 抗性品系与 *Bt* 抗性品系间的蛋白酶活性有明显的差异,以适应不同的药剂。

参考文献:

- [1] Griffiths J S, Aroian R V. Many roads to resistance :How invertebrates adapt to *Bt* toxins[J]. Bio Essays, 2005, 27(6): 614-624.
- [2] Ankersmit G W. DDT-resistance in *Plutella maculipennis* (Curtis) (lep.) in Java[J]. Bulletin of Entomological Research, 1953, 44: 421-425.
- [3] 程罗根,王荫长.小菜蛾的抗药性及其防治策略[J].世界农业,1996(10): 32-34.
- [4] 闫艳春,乔传令,钱传范,等.小菜蛾抗药性研究进展[J].昆虫知识,1997,34(5): 310-314.
- [5] Yu S J, Ngugen S N. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamond-back moth[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1992, 44: 74-81.
- [6] Wilson T G. Resistance of *Drosophila* to toxins[J]. Annual Review of Entomology, 2001, 46: 545-571.
- [7] Kao C H, Sun C N. In vitro degradation of some organophosphorus insecticides by susceptible and resistant diamond-back moth[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1991, 41(2): 132-141.
- [8] Yang Z X, Wen L Z, Wu Q J, et al. Effects of injecting cadherin gene dsRNA on growth and development in diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae)[J]. Journal Applied Entomology, 2009, 133: 75-81.
- [9] Xie W, Wang S L, Wu Q J, et al. Induction effects of host plants on insecticide susceptibility and detoxification enzymes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae)[J]. Pest Management Science, 2011, 67: 87-93.
- [10] 尹显慧,吴青君,张友军,等.多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾解毒酶系活力的影响[J].农药学报,2008,10(1): 28-34.
- [11] Byrne F J, Gorman K J, Cahill M, et al. The role of B-type esterase in conferring insecticide resistance in the tobacco whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn)[J]. Pest Management Science, 2000, 56: 867-874.
- [12] Rauch N, Nauen R. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae)[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2003, 54: 165-176.
- [13] Li F, Han Z J. Purification and characterization of acetylcholinesterase from cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover)[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2002, 51: 37-45.
- [14] James B S, George F S. Laboratory Experiments in Biological Chemistry[M]. San Francisco: Academic Press, 2008.
- [15] 唐振华,周成.解毒酶在小菜蛾幼虫抗药性中的作用[J].昆虫学报,1993,36(1): 8-13.
- [16] Rumpf S, Hetzel F, Frampton C. Lacewings (Neuroptera : Hemerobiidae and Chrysopidae) and integrated pest management : Enzyme activity as biomarker of sublethal insecticide exposure[J]. Journal of Economic Entomology, 1997, 90(1): 102-108.
- [17] 高希武,董向丽,郑炳宗.棉铃虫的谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs):杀虫药剂和植物次生性物质的诱导与GSTs对杀虫药剂的代谢[J].昆虫学报,1997,40(2): 122-125.
- [18] 吴刚,尤民生,赵士熙.抗性和敏感小菜蛾谷胱甘肽-S-转移酶和谷胱甘肽的比较[J].福建农业大学学报,2000,29(4): 478-481.
- [19] 梁沛,夏冰,石泰,等.阿维菌素和高效氯氰菊酯亚致死剂量对小菜蛾谷胱甘肽S-转移酶的影响[J].中国

- 农业大学学报, 2003, 8(3): 65–68.
- [20] 侯军, 马志卿, 冯俊涛, 等. 鬼臼毒素对小菜蛾的生物活性及对其几种代谢酶系的影响[J]. 昆虫学报, 2007, 50(9): 85–89.
- [21] 李腾武, 高希武, 郑炳宗, 等. 阿维菌素对小菜蛾的抗性选育及其对解毒酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 2000, 43(增刊): 38–43.
- [22] Tatun N, Singtripop T, Tungjitwitayakul J, et al. Regulation of soluble and membrane-bound trehalase activity and gene expression of the enzyme in the larval midgut of the bamboo borer *Omphisca fuscidentalis*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(8): 788–795.
- [23] Wegener C, Tschiedel V, Schlöder P, et al. The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia[J]. Journal of Experimental Biology, 2003, 206(7): 1233–1240.
- [24] Takahashi K. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 1968, 243: 6171–6179.
- [25] Becker A, Schlöder P, Steele J E, et al. The regulation of trehalose metabolism in insects[J]. Experientia, 1996, 52: 433–439.
- [26] Keller M, Sneh B, Strizhov N, et al. Digestion of δ -endotoxin by gut pmtases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 26: 365–373.
- [27] Shao Z Z, Cui Y L, Liu X L, et al. The processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1998, 72: 73–81.
- [28] 李秀岚, 李友莲, 张利军. 红蓼拒食活性组分的分离及其对小菜蛾幼虫消化酶活性的影响[J]. 植物保护, 2008, 34(2): 49–52.
- [29] Forcada C, Encarna A, Garcera M D, et al. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1996, 31: 257–272.
- [30] Oppert B, Kal J K, Donovan E, et al. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, 198 (3): 940–947.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 张 健