保护酶系在小菜蛾对阿维菌素抗性中的作用*

吴青君[1**] 张友军[1] 徐宝云[1] 张文吉[2]

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081;2. 中国农业大学 北京 100193)

摘 要 对小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)阿维菌素敏感(ABM-S)和抗性(ABM-R)种群的保护酶系(超氧化物歧化酶 SOD、过氧化物酶 POD 和过氧化氢酶 CAT)进行了活性比较。以单头虫表示酶活力,上述 3 种酶的活性与虫龄正相关,老熟幼虫期酶活性最高。总体上,ABM-S 种群的 3 种酶活性高于 ABM-R 种群,SOD 活性的种群差异随虫龄的增长而减小,1~2 龄幼虫 ABM-S 种群的 SOD 活性是 ABM-R 种群的 14.27 倍。POD 活性在 3 龄幼虫期性差异最大,为 4.80 倍。CAT 活性在 4 龄末期幼虫无种群差异,其它龄期的活性差异约 1~2 倍。上述结果表明,阿维菌素抗性并未导致小菜蛾保护酶系统活性增加,这也暗示了昆虫酶系统的能量保守性。

关键词 小菜蛾,阿维菌素,抗药性,保护酶系

The defending enzymes in abamectin resistant *Plutella xylostella*

WU Qing-Jun[1**] ZHANG You-Jun[1] XU Bao-Yun[1] ZHANG Wen-Ji[2]

(1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
2. Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The endogenous enzymes of the immune systems of abamectin susceptible (ABM-S) and resistant (ABM-R) *Plutella xylostella* (L.), including superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT), were examined to determine whether their activities were affected by insecticide resistance. These three enzymes' activities were positively correlated with larval stage in terms of enzyme activity per larva. On the whole, SOD, POD and CAT activity was lower in the ABM-R strain than in the ABM-S strain. Differences in SOD activity between the two strains decreased with each developmental stage. In the first to second instars, SOD activity in the ABM-S strain was 14.27-fold higher than in the ABM-R strain. The biggest difference in POD activity was observed in the third instar, in which there was 4.28-fold difference between strains. There was no significant difference in CAT activity between the late fourth instars of each strain but 1 to 2 fold difference in the activity of this enzyme was found in other developmental stages. These results indicate that pesticide resistance does not induce an increase in antioxidant enzyme activity, which suggests that there is a kind of energy conservation in the insect enzyme system.

Key words *Plutella xylostella*, abamectin, resistance, defending enzymes

昆虫在长期进化过程中,除形成大量的降解外来有害化合物的解毒酶系外,还存在着超氧化物歧化酶(superoxide dismustase,简称 SOD)、过氧化物酶(peroxidase,简称 POD)和过氧化氢酶(catalse,简称 CAT)等各种保护酶系,其主要功能是清除昆虫体内的自由基,防御活性氧或其它过氧化物自由基对细胞膜系统的伤害(Allen *et al.*, 1984; Allen and Balin, 1989; Bolter and Chefurka, 1990a)。活性氧是指具有比氧活泼的某些氧化代谢产物及其衍生的含氧物质,主要包括超氧阴离子($\cdot O_2^-$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot OH$)、单线态氧($^1O_2$)以及脂类过氧化物等。H_2O_2 是细胞代谢的正常产物,在铁存在的情况下,能与超氧自由基反应产生活性更高的 $\cdot OH$,若不及时清除会导致生物氧毒害(Fridovich, 1977)。自由基通过与细胞的整合作用,与多种生化成分如脂质、蛋白质、核酸等反应,对电子进行链式传递并放大,从而破坏细胞的化学结构,干扰其正常功能。若

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803001)。

**通讯作者,E-mail: wuqj@mail.caas.net.cn

收稿日期:2011-01-28,接受日期:2011-02-15

过度积累则造成对生物系统的致命伤害。

在昆虫精密而复杂的防御体系中，超氧化物歧化酶的作用最为重要。SOD 的功能主要是催化氧自由基的歧化反应，生成 H_2O_2 和 H_2O，而 H_2O_2 又可被过氧化氢酶和过氧化物酶转化成 O_2 和 H_2O（McCord and Fridovich，1969）。因此，SOD、POD 和 CAT 在清除体内自由基，防止膜脂氧化，减少膜系统伤害等方面具有一定的保护作用。在正常生理状态下，昆虫体内的 3 种酶和自由基维持在一定的平衡状态，但在受到杀虫剂、病原菌、极端温度等逆境条件胁迫时，会诱导其含量水平发生改变（冯宏祖等，2008；王楠等，2008；朱建兰等，2008；陈常理等，2010）。抗性汰选过程中，昆虫不断受到杀虫剂的选择压力，在这种不利的生存环境中，昆虫的保护酶防御系统是否发生相应变化，目前的报道较少。

本文主要研究了阿维菌素汰选后的抗性种群小菜蛾 SOD、POD 和 CAT 的活性变化，并对其在抗性中的作用进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

相对敏感种群（ABM-S）：1990 年采自深圳田间，于室内连续饲养，未接触任何杀虫药剂。抗性种群（ABM-R）：用阿维菌素对 ABM-S 种群汰选而得，与 ABM-S 种群相比，抗性指数为 80 多倍。

1.2 供试试剂

聚乙烯吡咯烷酮 Polyvinyl-pyrrolidone（PVP），Sigma 公司；愈创木酚 Guaiacol，北京化工厂；氯化硝基蓝四唑 Nitrotetrazolium blue chloride（NBT），上海丽珠东风生物试剂有限公司；甲硫氨酸 L-methionine（Met），上海康达氨基酸厂；核黄素 Lactoflavin，上海试剂厂；考马斯亮蓝 G-250 Coomassie brilliant blue G-250，Fluka 公司；牛血清白蛋白 Albumin bovine（BSA），Sigma 公司。

1.3 保护酶系活性测定

酶液制备参照李周直等（1994）的方法。取不同龄期幼虫，用 pH7.0 的 0.05 mol/L PBS 缓冲液（含 1% 聚乙烯吡咯烷酮）冰浴匀浆，然后在 2℃ 下，15 000 rpm 离心 20 min，取上清液作为酶源。

1.3.1 超氧化物歧化酶（SOD）活性测定 参照 Giannopolitis 和 Ries（1977）和赵可夫（1993）方法。取反应介质（0.05 mol/L pH7.8 的 PBS，其中含 77.12 μmol/L NBT，0.1 mmol/L EDTA 和 13.37 mmol/L 甲硫氨酸）3.6 mL，加入适量稀释的酶液 50 μL，最后加 0.2 mmol/L 的核黄素 0.4 mL，置于 4 000 lx 光照条件下进行光化学反应 15 min，然后用黑暗终止反应，立即在 UV-300 紫外分光光度计 560 nm 处比色，重复 4 次。一个酶活力单位定义为将 NBT 的还原抑制到对照的 50% 时所需的酶量，计算方法为：

酶活力 $= \triangle A \times N \times 60 / A_0 \times W \times T \times V \times 50\%$，其中 $\triangle A$ 表示对照管和样品管的 OD 差值；N 表示酶液总体积；W 表示蛋白质含量（mg/mL）；T 表示光反应时间（min）；V 表示加入的酶液体积；60 表示 60 min（计算的是 1 h 的酶活力）。

1.3.2 过氧化氢酶（CAT）活性测定 参照 Chance 和 Machly（1955）的高锰酸钾滴定分析法。反应混合液中包括 0.2 mol/L pH7.0 的 PBS 2.5 mL，0.1 mol/L 的 H_2O_2 1.0 mL 及蒸馏水 6.5 mL，再加入酶液 0.2 mL，上述溶液在烧杯中混匀，反应 2 min 后加入 10% 的 H_2SO_4 2.0 mL 终止反应，再用 2 mmol/L 的 $KMnO_4$ 滴定剩余的 H_2O_2，根据 H_2O_2 的消失量计算 CAT 活性，重复 4 次。

1.3.3 过氧化物酶（POD）活性测定 参照 Simon 等（1974）方法。在试管中依次加入 2.0 mL PBS（pH6.0，0.2 mol/L）、0.12 mol/L 的愈创木酚 2.0 mL、0.1 mol/L 的 H_2O_2 1.0 mL 和酶液 0.2 mL，混匀后，反应 10 min 后，在 470 nm 处比色。以每秒钟 OD_{470} 增加 0.01 单位为酶活力，计算方法：$OD_{470}/0.01 \times T \times V \times W$ 其中 0.01 表示 0.01 个单位，T 为时间（s），V 为加入的酶体积，W 为蛋白质含量，重复 4 次。

1.4 蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量（Bradford，1976）。

1.5 数据分析方法

方差分析采用 SAS 软件（Proc ANOVA；SAS Institute，2000），采用 Fisher' LSD 进行差异显著性测定（$P < 0.05$）。

2 结果与分析

2.1 超氧化物歧化酶（SOD）

从表 1 可以看出，ABM-S 种群的 SOD 活力始

终高于 ABM-R 种群。其中在 1 ~ 2 龄期,ABM-S 种群的 SOD 活力为 487.94 OD/mg 蛋白,是 ABM-R 种群(34.19 OD/mg 蛋白)的 14.27 倍,种群差异极为显著,但随着幼虫龄期的增长,SOD 活性的种群差异逐渐减小,3 龄和 4 龄初期 S/R 值分别为 3.37 和 1.85 倍,4 龄末期 SOD 活性无显著种群差异。

表 1　阿维菌素敏感和抗性种群小菜蛾幼虫不同发育龄期超氧化物歧化酶的比活力比较

Table 1　Comparison of superoxide dismutase activity between different instars of the abamectin susceptible and resistant strains of *Plutella xylostella*

龄期 Instar	种群 Strain	比活力(OD/mg 蛋白) Specific activity	S/R
1 ~ 2	ABM-S	487.94 ± 10.15	
	ABM-R	34.19 ± 3.32	14.27*
3	ABM-S	440.91 ± 17.86	
	ABM-R	130.67 ± 2.53	3.37*
4(24 h)	ABM-S	41.61 ± 2.41	
	ABM-R	22.50 ± 1.17	1.85*
4(96 h)	ABM-S	144.02 ± 9.04	
	ABM-R	107.99 ± 7.03	1.33

注:* 表示差异显著,$P < 0.05$。下表同。

Data followed by asterisk (*) indicates significant difference at 0.05 level. The same below.

单头幼虫的 SOD 活力与虫龄一致(图 1),即低龄期活性最低,随龄期增长 SOD 活性随之上升。ABM-S 种群各龄期之间 SOD 活力增长速率分别为 1.66、2.0 和 4.9 倍,4 龄末期的 SOD 活力为 8.9091 OD/头,比 1 ~ 2 龄提高 16.2 倍;ABM-R 种群各龄期之间的 SOD 活力增长速率为 2.56、1.54 和 5.79 倍,4 龄末期的 SOD 活力为 7.3264 OD/头,比 1 ~ 2 龄提高 22.7 倍。比较 ABM-S 和 ABM-R 种群,除 3 龄时 ABM-R 略大于 ABM-S 外,其它各龄期 ABM-S 种群都较 ABM-R 大。

2.2　过氧化物酶(POD)

以每毫克蛋白表示酶活力,不同发育龄期 ABM-S 种群的 POD 活力均显著高于 ABM-R 种群(表 2)。其中 3 龄幼虫期 ABM-S 种群的 POD 活力为 0.2158 OD/mg 蛋白·s,是 ABM-R 种群的 4.80 倍,种群差异最大。1 ~ 2 龄期、4 龄初和 4 龄末期的 S/R 比值分别为 2.71、3.20 和 2.49 倍。

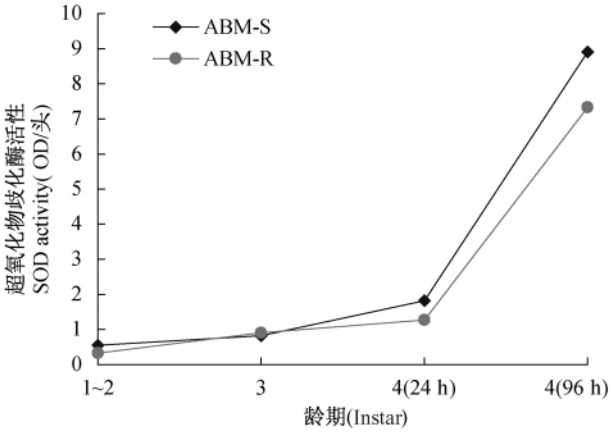

图 1　阿维菌素敏感和抗性种群小菜蛾不同发育龄期单头幼虫的超氧化物歧化酶活性

Fig. 1　Superoxide dismutase activity per larva at different instars of the abamectin susceptible and resistant strains of *Plutella xylostella*

以单头幼虫表示酶活力,ABM-S 和 ABM-R 种群的 POD 活力随龄期的增长而增大(图 2)。ABM-S 种群的 POD 活力随幼虫龄期的增长波动较大,进入 4 龄期活性急剧上升,各龄期间的增长速率分别为 2.27、6.01 和 1.82 倍,末龄幼虫的活力为(63.92×10^{-3})OD/头,是 1 ~ 2 龄期的 24.9 倍;ABM-R 种群的 POD 活力在幼虫发育末期上升最快,达到(46.75×10^{-3})OD/头,为 4 龄初期的 7.5 倍、1 ~ 2 龄期的 20.2 倍,1 ~ 3 龄期则缓慢上升,各龄期间的增长速率分别为 1.49 和 1.80 倍。

表 2　阿维菌素敏感和抗性种群小菜蛾幼虫不同发育龄期过氧化物酶的比活力比较

Table 2　Comparison of peroxidase activity between different instars of the abamectin susceptible and resistant strains of *Plutella xylostella*

龄期 Instar	种群 Strain	比活力(OD/mg 蛋白·s) Specific activity	S/R
1 ~ 2	AVM-S	0.4496 ± 0.1177	
	AVM-R	0.1661 ± 0.0066	2.71*
3	AVM-S	0.2158 ± 0.0065	
	AVM-R	0.0450 ± 0.0017	4.80*
4(24 h)	AVM-S	0.3389 ± 0.0091	
	AVM-R	0.1060 ± 0.0079	3.20*
4(96 h)	AVM-S	0.4776 ± 0.0123	
	AVM-R	0.1920 ± 0.0043	2.49*

2.3 过氧化氢酶(CAT)

ABM-S 和 ABM-R 种群不同发育龄期 CAT 活力比较见表 3。除 4 龄末期外,其它发育阶段 ABM-S 种群的 CAT 活性均显著高于 ABM-R 种群,其中以 3 龄幼虫期的种群差异最大,达到 1.99 倍,其次为 1 ~ 2 龄期,为 1.92 倍,而 4 龄幼虫初期为 1.37 倍。

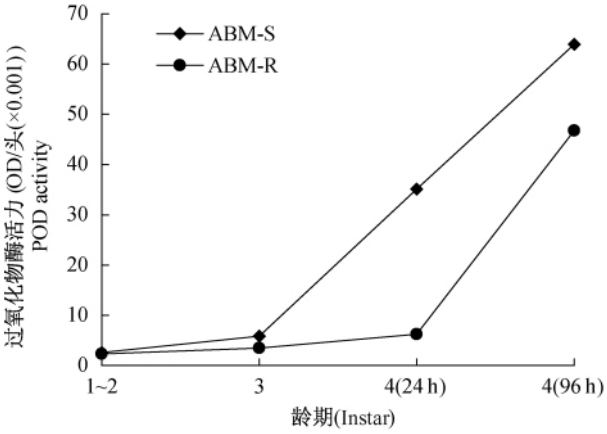

图 2 阿维菌素敏感和抗性种群小菜蛾不同发育龄期单头幼虫的过氧化物酶活性

Fig. 2 Peroxide activity per larva at different instars of the abamectin susceptible and resistant strains of *Plutella xylostella*

表 3 阿维菌素敏感和抗性种群小菜蛾幼虫不同发育龄期过氧化氢酶的比活力比较

Table 3 Comparison of catalase activity between different instars of the abamectin susceptible and resistant strains of *Plutella xylostella*

龄期 Instar	种群 Strain	比活力(μmol/mg 蛋白) Specific activity	S/R
1 ~ 2	AVM-S	677.52 ± 12.40	
	AVM-R	353.21 ± 19.99	1.92*
3	AVM-S	248.20 ± 6.21	
	AVM-R	124.67 ± 4.71	1.99*
4(24 h)	AVM-S	192.29 ± 2.34	
	AVM-R	140.75 ± 3.97	1.37*
4(96 h)	AVM-S	152.23 ± 5.26	
	AVM-R	146.82 ± 4.36	1.04

单头幼虫的 CAT 活力随虫龄的增长而增大(图 3),但龄期间的酶活力增长速率较 SOD 和 POD 为缓慢。对于 ABM-S 种群,增长速率分别为 1.9、1.52 和 3.6 倍,4 龄末期的活力是 1 ~ 2 龄期的 8.9 倍;对于 ABM-R 种群,增长速率为 1.73、2.0 和 2.6 倍,4 龄末期的活力是 1 ~ 2 龄期增长 7.15 倍。

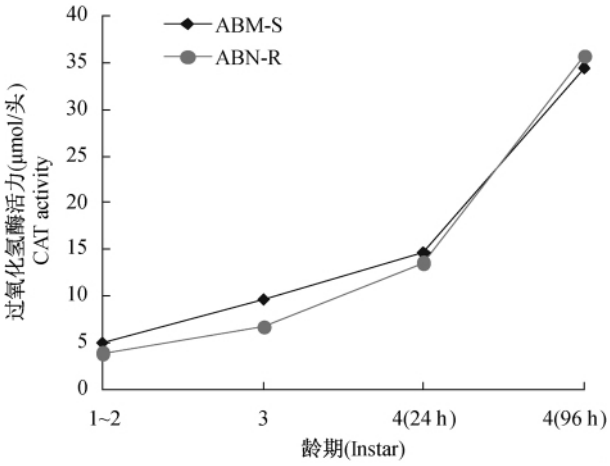

图 3 阿维菌素敏感和抗性种群小菜蛾不同发育龄期单头幼虫的过氧化氢酶的活性

Fig. 3 Catalase activity per larva at different instars of the abamectin susceptible and resistant strains of *Plutella xylostella*

3 讨论

早期有研究表明,SOD 活性与虫龄呈负相关(李周直等,1994)。本研究用单头幼虫表示酶活力,观察到 SOD、POD 和 CAT 活性均随幼虫龄期的增长而增大,到老熟幼虫期达最大。这种正相关性的实际意义是,田间施药应掌握在低龄幼虫期,即昆虫对药剂相对敏感的时期使用。

杀虫剂处理后的昆虫 SOD、POD 和 CAT 活性变化因虫而异。李周直等(1994)用溴氰菊酯分别处理菜粉蝶 *Pieris rapae*、褐边绿刺蛾 *Parasa consocia* 和褐刺蛾 *Thosea pastornata*,中毒昆虫的 3 种酶活力均高于对照昆虫,且随中毒程度的加重而逐渐上升,接近死亡时又急剧下降。Bolter 和 Chefurka(1990b)用熏蒸剂 PH_3 分别处理 PH_3 - 敏感(S - 昆虫)和 PH_3 - 抗性(R - 昆虫)谷象 *Sitophilus granarius*,结果 POD 活性 S - 昆虫和 R - 昆虫分别下降 65% 和 45%,CAT 活性 S - 昆虫被抑制 34%,而对 R - 昆虫无应影响,SOD 活性 S - 昆虫提高 2 倍,R - 昆虫没有活性变化。冯宏祖等(2008)的研究表明,朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 经阿维菌素处理后,SOD 和 CAT 活性

明显高于正常虫体,而 POD 变化不明显。

本实验未对试虫进行药剂处理而直接比较敏感和抗性种群的酶活力。敏感种群的 SOD、POD 和 CAT 活性均显著高于抗性种群。Bolter 和 Chefurka(1990b)的结果显示 PH_3 - 敏感和 - 抗性种群的 POD 和 SOD 活性无种群差异,而敏感种群的 CAT 活性显著高于抗性种群(62%)。显然,昆虫在杀虫剂选择压力下以至逐渐适应的过程中,抗性并未使其保护酶系统活性普遍增加,相反的是酶活性等于或低于敏感种群。这种现象说明了昆虫酶系统的能量保守性,即抗性昆虫维持高水平的酶活性是一个大量的耗能过程,作为害虫防御机制的酶蛋白的合成受到虫体内外多种因素的调控(Brattsten *et al.*, 1986),面对大量的有害外源化合物杀虫剂的侵害,昆虫可能更需要对其快速降解和代谢,因此大量合成解毒酶并维持在一定的高水平,而作为补偿或为了保持体内能量平衡,保护酶系统则不必为此消耗能量。

参考文献(References)

Allen RG, Balin AK, 1989. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic. Biol. Med.*, 6(6): 631—639.

Allen RG, Farmer KJ, Sohal RS, 1984. Effect of diamide administration on longevity, oxygen consumption, superoxide dismutase, catalase, inorganic peroxides and glutathione in adult house fly, *Musca domestica*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 78:31—33.

Bolter CJ, Chefurka W, 1990a. Extramitochondrial release of hydrogen peroxide from insect and mouse liver mitochondria using the respiratory inhibitors phosphine, myxothiazol, and antimycin and spectral analysis of inhibited cytochromes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 278 (1): 65—72.

Bolter CJ, Chefurka W, 1990b. The effect of phosphine treatment on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in the granary weevil, *Sitophilus granaries*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 36:52—60.

Bradford MM, 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 255—260.

Brattsten LB, Holylke CW, Leeper JR, Raffa KF, 1986. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science*, 231:1255—1260.

Chance BB, Machly AC, 1955. Assay of catalase and peroxide // Colowich SP, Kaplan NO (eds.). Methods in Enzymology, New York, Academic Press. 764.

陈常理,韦茂兔,李明江,沈福泉,杨重卫,吕仲贤,郑许松,徐红星,2010. 温度对 B 型烟粉虱存活率和保护酶系的影响. 浙江农业科学,(4):853—857.

冯宏祖,刘映红,何林,陆蕊娥,杨大兴,2008. 阿维菌素和温度胁迫对朱砂叶螨自由基及保护酶活性的影响. 植物保护学报,35(6):530—536.

Fridovich I, 1977. Oxygen is toxic! *Bioscience*, 27 (7): 462—466.

Giannopolitis SCN, Ries SK, 1977. Superoxide dismutase Ⅱ. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein. *Plant Physiol.*, 59:315—318.

李周直,沈惠娟,蒋巧根,嵇保中,1994. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究. 昆虫学报,37(4):399—403.

McCord JM, Fridovich I, 1969. Superoxide dismutase I. an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244: 6049—6055.

Simon LM, Fatrai Z, Jonas DE, Matkovics B, 1974. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgris*. *Biochem. Physiol.*, 166: 387—392.

王楠,张志春,王满囷,吴胜兵,李慧,张国安,2008. 腐胺对小菜蛾幼虫生长及保护酶活力的影响. 昆虫知识,45(4):573—576.

赵可夫,1993. 植物抗盐生理. 北京:中国科学技术出版社. 232—233.

朱建兰,王国利,刘谨,张自和,2008. 四脊裸胞壳 Dh 菌株侵染对钩麦蛾幼虫体内保护酶的影响. 草地学报,16(2):121—125.