研究论文

# 肚倍蚜对高单宁环境的抗氧化反应研究

李 芒* 王 永 雷朝亮**

(华中农业大学植物科学技术学院 湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室 武汉 430070)

**摘 要** 肚倍蚜 *Kaburagia rhusicola* Takagi 是我国的一种重要的资源昆虫,其瘿内生活环境较特殊(虫瘿单宁含量为 70%)。为了解肚倍蚜适应高单宁环境生化机制,本研究以性母为对照,测定了瘿内不同时期肚倍蚜体内总抗氧化能力(T-AOC)以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和谷胱甘肽 *S*-转移酶(GST)的活性,分析了肚倍蚜体内的抗氧化系统对高单宁环境胁迫所作出的相关反应。研究表明,与对照相比,瘿内时期肚倍蚜体内的总抗氧化能力、CAT 和 POD 活性均显著升高;SOD 和 GST 活性除在有翅蚜阶段与对照无差异,在其他阶段的活性均显著高于对照。本研究验证了高单宁环境对肚倍蚜造成氧化胁迫作用,认为肚倍蚜体内的抗氧化能力和抗氧化酶活性提高是其对高单宁环境的一种适应。

**关键词** 单宁, 氧化胁迫, 保护酶, 肚倍蚜

# Research on the antioxidant response of *Kaburagia rhusicola* in high tannin environment

LI Mang* WANG Yong LEI Chao-Liang**

(Hubei Insect Resource Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory, College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** *Kaburagia rhusicola* Takagi (Hemiptera: Pemphigidae) is an economically important insect in China that lives in a special environment—galls with a high (70%) tannin content. In order to explore the biochemical mechanisms by which these aphids have adapted to tolerate tannin, we treated the sexupara as the control and measured the total antioxidant capacity and antioxidant enzymes activities of SOD, CAT, POD and GST in adult *K. rhusicola* of different generations. We found that, with the exception of the alate virginoparae generation, activities of SOD and GST in aphid generations living within galls were higher than in the control, and that T-AOC and POD activities increased over the course of the galls' life. Our results confirm that a high tannin environment increases the level of oxidative stress on *K. rhusicola* and suggests that antioxidant activity may be an adaptation of aphids to the high-tannin gall environment.

**Key words** tannin, oxidative stress, antioxidant enzymes, *Kaburagia rhusicola*

肚倍蚜 *Kaburagia rhusicola* Takagi 隶属于半翅目 Hemiptera 蚜总科 Aphidoidea 瘿棉蚜科 Pemphigidae 铁倍蚜属 *Kaburagia*,是我国林业上的一种重要经济昆虫。研究表明,肚倍蚜为转寄主寄生昆虫,生活史比较复杂。每年 2 月下旬,一部分苔藓上的肚倍蚜分化为性母(春迁蚜),并迁飞至青麸杨上产下性蚜(赖永祺等,1992)。1 个月后,干母由雌性蚜体内排出,爬至幼嫩复叶小叶的上表面,选择合适的小叶侧脉处致瘿。肚倍是肚倍蚜致瘿产生的一种五倍子,其单宁含量为 70% 左右(李志国等,2003)。肚倍蚜在肚倍内经 2 代干雌发育为秋迁蚜。当肚倍成熟爆裂时,秋迁蚜迁飞至苔藓上,产生侨蚜完成 1 个生活史。

单宁,又称植物多酚,是一种重要植物次生代

* E-mail: lemang@189.cn

**通讯作者,E-mail: ioir@mail.hzau.edu.cn

收稿日期:2011-03-01,接受日期:2011-05-28

谢物质,其含量在维管束植物中居第 4 位(Hernes and Hedges, 2000)。自从 Feeny(1968, 1970)发现单宁能保护植物不受鳞翅目幼虫取食,越来越多的研究证明,单宁在植物抵御植食动物的侵害过程中发挥着重要作用(Park *et al.*, 2004)。目前,单宁对昆虫的毒性作用机理还不是十分清楚(Gross *et al.*, 2008)。研究表明,单宁的毒性作用可能来自于其被氧化时产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)(Barbehenn *et al.*, 2005)。在一定条件下,单宁经氧化产生的活性氧如:半醌、醌、过氧化氢等物质作为强氧化剂不仅能破坏肠壁上的营养物质而且在中肠组织中产生了氧化胁迫(oxidative stress, OS),过高的氧化胁迫会给多种生物分子如:营养分子、细胞膜和 DNA 带来破坏作用,进而对昆虫产生毒性作用(Summers and Felton, 1994; Bi and Felton, 1995; Bi *et al.*, 1997)。

为适应食物带来的氧化胁迫作用,昆虫通过进化出复杂的抗氧化系统以适应活性氧所带来的毒性作用(Ahmad, 1992)。昆虫的抗氧化系统主要包括酶促和非酶促两个系统。其中酶促体系主要由超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)组成(Felton and Summers, 1995; Wang *et al.*, 2001)。研究表明,当昆虫摄入包括单宁在内的植物多酚物质时,其体内的抗氧化酶活性将相应升高,以应对由此产生的氧化胁迫(Pritsos *et al.*, 1988; Ahmad and Pardini, 1990; Peric *et al.*, 1997; Krishnan and Kodrick, 2006)。目前,国内关于肚倍蚜的研究多集中在生活史观察和分类学研究方面(赖永祺等, 1992; 李志国等, 2003),其生理学研究不多。为了解肚倍蚜对瘿内环境的适应机制,本研究测定了不同时期肚倍蚜的总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)和 SOD、CAT、POD 和 GST 抗氧化酶的活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

供试昆虫采于湖北省十堰市竹山县人工肚倍林,昆虫样品包括性母(sexupara)、一代干雌成虫(first generation adult, 1GA)、二代干雌成虫(second generation adult, 2GA)、无翅蚜(wingless virginoparae, WV)和有翅蚜(alate virginoparae, AV)。供试昆虫分别采于 2009 年 2 月 25 日,5 月 30 日,6 月 15 日、7 月 15 日和 7 月 15 日。昆虫在收集后,经液氮运输后,放入 -80℃超低温冰箱低温保藏备用。

### 1.2 酶液制备及蛋白含量测定

精确称取 0.1 g 蚜虫及时置于灭菌 2 mL 离心管中,加入 1 mL 昆虫生理盐水(150 mmol NaCl, 3 mmol KCl, 4.9 mmol $MgCl_2$, 1.5 mmol $NaH_2PO_4$, 0.6 mmol $NaHCO_3$, pH 7.4)(Yack, 1993),在冰上迅速匀浆,约 30 s 作用。然后,于 4℃,10 000 g,离心 20 min,将上清液转移到新的离心管中,冰上放置备用。

蛋白测定采用考马斯亮蓝法,用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。

### 1.3 相关活性测定

T-AOC、SOD、CAT、POD 和 GST 均由南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。

**1.3.1 总抗氧化能力(T-AOC)测定原理** 机体中的抗氧化物质将 $Fe^{3+}$ 还原成 $Fe^{2+}$,后者可与菲啉类物质结合生成有色络合物,在 520 nm 波长处吸光值变化可得抗氧化能力高低。以 37℃下每毫克组织蛋白每分钟每增加 0.01 吸光值变化为一个活力单位。

**1.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定原理** 黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot}$),后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色。利用样品中 SOD 抑制反应体系中的超氧阴离子,通过测定 550 nm 波长下亚硝酸盐吸光值变化计算 SOD 活性。以 37℃下每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量定义为一个 SOD 活力单位。

**1.3.3 过氧化氢酶(CAT)活性测定原理** 利用钼酸铵快速终止 CAT 分解过氧化氢反应,剩余过氧化氢与钼酸铵作用产生黄色络合物。在 405 nm 处测定吸光值计算过氧化氢酶活力。以 37℃下每毫克组织蛋白每秒分解 1 μmol 的 $H_2O_2$ 的量为一个活力单位。

**1.3.4 过氧化物酶(POD)活性测定原理** 利用 POD 催化过氧化氢反应原理,通过测定 420 nm 处吸光值变化计算 POD 活性。以 37℃下每毫克组

织蛋白每分钟催化 1 μg 底物的量定义为一个酶活力单位。

**1.3.5　谷胱甘肽 *S*-转移酶(GST)酶活性测定原理**　GST 具有催化还原性谷胱甘肽(GSH)与 1 - 氯 - 2,4 - 二硝基苯(CDNB)结合的能力,通过检测 412 nm 波长处 GSH 浓度高低可以测定 GST 活性大小。以每毫克组织蛋白,在 37℃反应扣除非酶促反应,GSH 浓度降低 1 μmol/L 作为一个酶活力单位。

**1.3.6　具体操作步骤和计算方法**　具体操作步骤参照试剂盒说明略有改进。将各试剂按一定比例减量加入反应体系。反应结束后,各吸取 200 μL 反应液,加入 96 孔平板中,于指定波长处,用 Synergy™ HT 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司生产)测定各孔吸光度。计算方法参照试剂盒说明。

### 1.4　数据分析

试验数据用 SPSS11.5 统计软件(SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)中的 One-Way ANOVA 方差分析,平均数采用 Duncan 新复极差法进行差异显著性检测。

## 2　结果与分析

### 2.1　肚倍蚜总抗氧化能力变化

肚倍蚜的总抗氧化能力的变化如图 1 所示。从图 1 的结果可以看出,与对照性母相比,不同时期的肚倍蚜体内的总抗氧化能力存在着较大差异。肚倍蚜的总抗氧化能力最大值出现在有翅蚜(AV),二代干雌(2GA)和无翅蚜(WV)的总抗氧化能力处于同一水平,且低于有翅蚜($P < 0.05$, ANOVA),而一代干雌为瘿内时期抗氧化能力最低时期。整体看,瘿内时期的肚倍蚜总抗氧化能力普遍显著高于对照水平($P < 0.05$, ANOVA)。表明瘿内高单宁环境显著增加肚倍蚜总抗氧化能力。

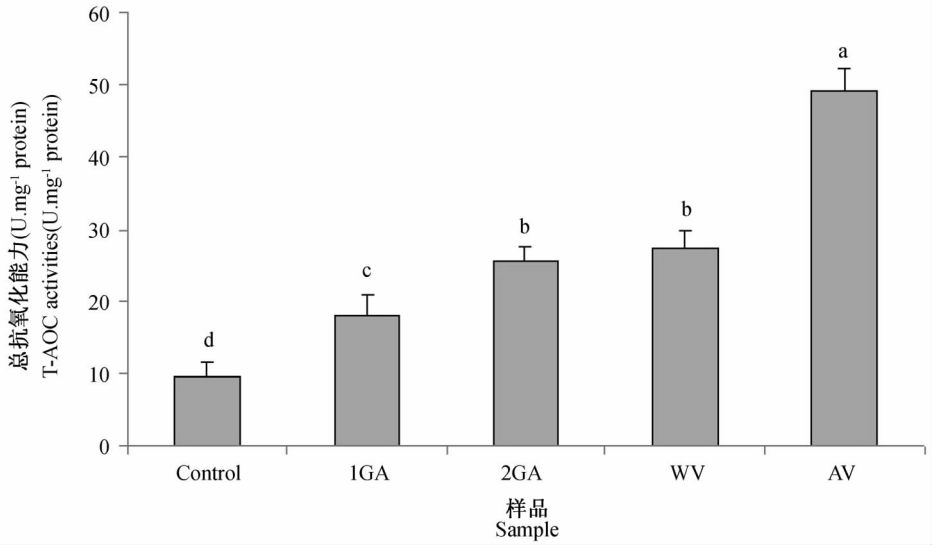


**图 1　肚倍蚜总抗氧化能力变化**

**Fig. 1　The changes of T-AOC activities in *Kaburagia rhusicola***

Control:性母(sexupara);1GA:一代干雌成虫(first generation adult);2GA:二代干雌成虫(second generation adult);WV:无翅蚜(wingless virginoparae);AV:有翅蚜(alate virginoparae),下图同 The same below.

图中数值为平均值 ± 标准差(n = 15),不同小写字母表示差异显著 $P < 0.05$(ANOVA),下图同。

Data are means ± SD, and followed by different letters indicate significantly different at 0.05 level (ANOVA). The same below.

### 2.2　肚倍蚜超氧化物歧化酶活性变化

肚倍蚜体内 SOD 酶活性变化如图 2 所示。从图 2 可以看出,与对照性母相比,除有翅蚜(AV)时期,SOD 酶活性处于相对较低水平,且与对照无

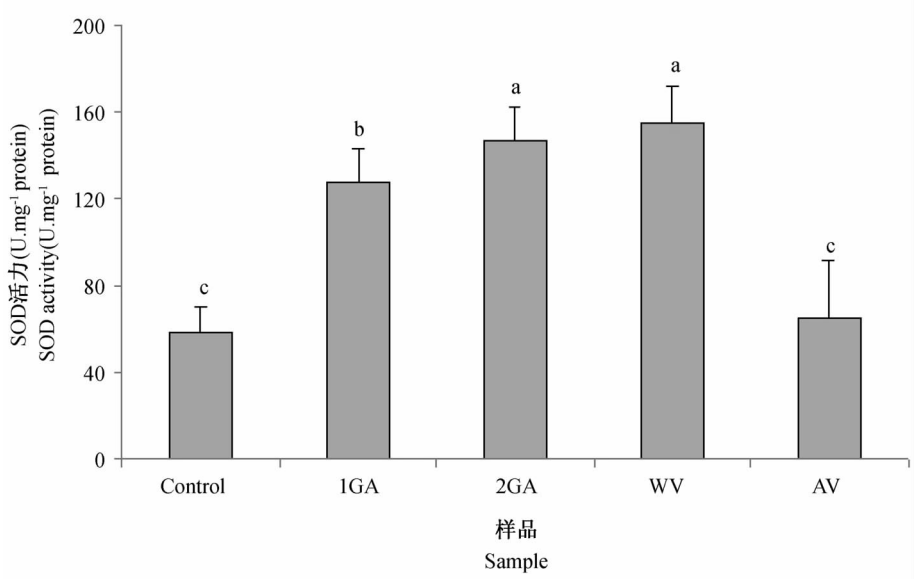


**图 2　肚倍蚜 SOD 酶活性变化**

**Fig. 2　The change of SOD activity in *Kaburagia rhusicola***

显著差异;瘿内时期的一代干雌(1GA)、二代干雌(2GA)和无翅蚜(WV)的 SOD 酶活性显著升高($P<0.05$, ANOVA),肚倍蚜 SOD 酶活性最高时期为二代干雌(2GA)和无翅蚜(WV)时期。结果表明虫瘿环境对肚倍蚜体内 SOD 酶活性影响显著。

### 2.3　肚倍蚜过氧化氢酶活性变化

图 3 为肚倍蚜体内 CAT 酶的活性变化。从图 3 可以看出,与对照相比,瘿内时期的肚倍蚜体内 CAT 活性差异显著($P<0.05$, ANOVA)。其中无翅蚜(WV)体内 CAT 酶活性最高,有翅蚜(AV)次之。无翅蚜和有翅秋千蚜 CAT 活性为对照 4 倍以上,一代干雌(1GA)和二代干雌(2GA)的 CAT 活性在瘿内时期相对较低,但均显著高于对照。表明肚倍蚜体内 CAT 酶受高单宁环境影响显著。

### 2.4　肚倍蚜过氧化物酶活性变化

肚倍蚜体内 POD 酶活性变化如图 4 所示。

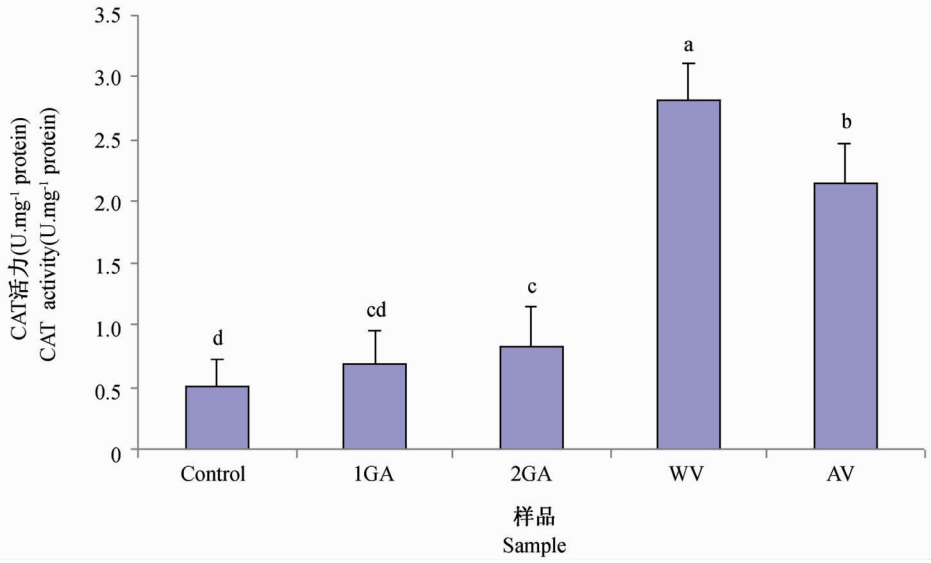


**图 3　肚倍蚜 CAT 酶活性变化**

**Fig. 3 The change of CAT activity in *Kaburagia rhusicola***

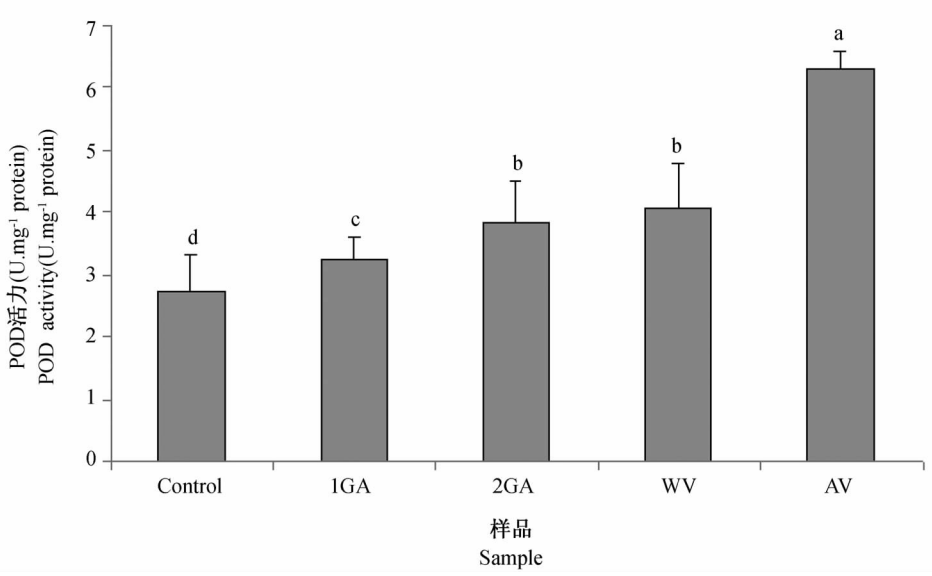


**图 4　肚倍蚜 POD 酶活性变化**

**Fig. 4　The change of POD activity in *Kaburagia rhusicola***

POD 酶活性变化与总抗氧化能力变化较类似。瘿内时期的酶活性显著高于对照($P < 0.05$, ANOVA),有翅蚜(AV)为 POD 酶活性最高时期,二代干雌(2GA)和无翅蚜(WV)的酶活性处于相同水平,而一代干雌酶(1GA)活性显著低于瘿内其他时期,从数值上来看,从性母到有翅蚜世代,POD 酶活性呈上升趋势。表明高单宁环境能显著增加肚倍蚜体内 POD 酶活性。

### 2.5　肚倍蚜谷胱甘肽 *S*-转移酶活性变化

图 5 为肚倍蚜体内的 GST 酶活性变化。从图 5 可以看出,与对照性母相比。除有翅蚜(AV)时期,GST 酶活性处于相对较低水平,且与对照无显著差异;一代干雌(1GA)、二代干雌(2GA)和无翅蚜(WV)体内的 GST 酶活显著高于对照性母($P < 0.05$, ANOVA),二代干雌(2GA)为 GST 酶活性最高时期。表明瘿内环境对肚倍蚜 GST 酶活性影响

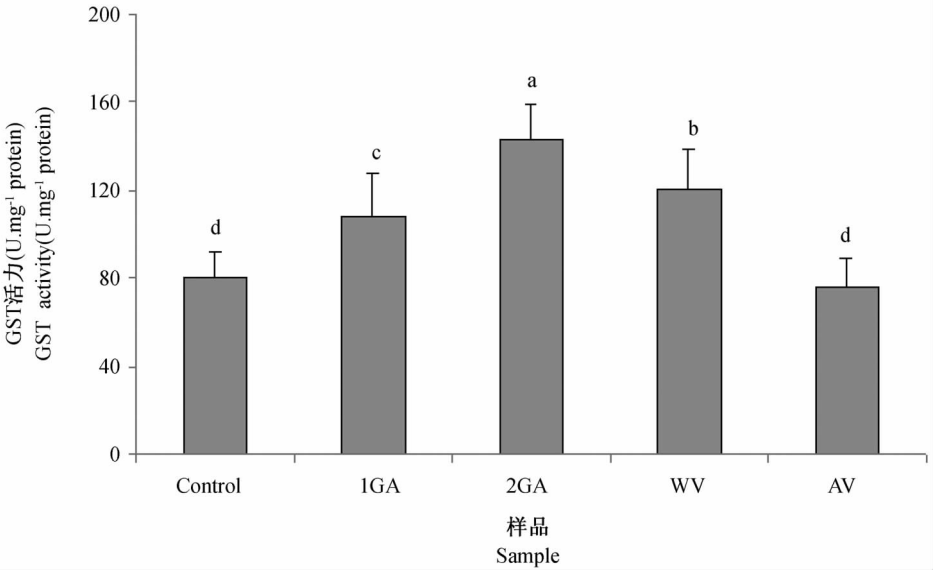


**图 5　肚倍蚜 GST 酶活性变化**

**Fig. 5　The change of GST activity in *Kaburagia rhusicola***

显著。

## 3 讨论

蚜虫为刺吸式口器昆虫,其取食方式较为特殊。取食过程中,蚜虫对植物的刺探行为会引起取食部位酚类物质的积累(Miles, 1999),由于依靠植物内压被动取食,酚类物质不可避免地进入蚜虫体内,这一现象已在蚜虫的蜜露或腹管分泌物中得到了验证(Dreyer *et al.*, 1985; Molyneux *et al.*, 1990)。酚类物质在蚜虫体内的代谢方式复杂,目前很少见到相关报道。但有研究表明,酚氧化酶在蚜虫适应酚类物质中发挥着重要作用(Urbanska *et al.*, 1998)。蚜虫唾液腺中产生的酚氧化酶不仅干扰了植物体内正常的氧化还原反应的平衡(Miles and Oertli,1993),同时也参与了酚类物质的解毒作用(Peng and Miles, 1988)。蚜虫的取食行为表明,蚜虫的唾液在分泌后并非进入植物组织中,而是在与植物汁液混合后再进入蚜虫的肠道中(Tjallingii, 2006)。由此可以推断,混有酚氧化酶的酚类物质在蚜虫的肠道中存在发生氧化反应的可能。植物多酚的体内氧化容易对生物机体组织产生氧化胁迫(Barbehenn *et al.*, 2008)。为了避免多酚氧化所产生的各种自由基的毒害作用,一些昆虫通常利用体内抗氧化系统清除体内过多的自由基(Gross *et al.*, 2008)。因此,伴随着植物多酚的取食,昆虫体内的抗氧化酶系通常会发生相应的变化(Pritsos *et al.*, 1988; Ahmad *et al.*, 1991; Peric *et al.*, 1997; Krishnan and Kodrick, 2006)。本次研究以性母为对照,比较了瘿内不同时期肚倍蚜的 T-AOC、SOD、CAT、POD 和 GST 活性变化。结果表明,瘿内时期肚倍蚜的总抗氧化能力和抗氧化酶的活性均有显著提高,这从一个侧面验证了单宁环境对肚倍蚜产生了氧化胁迫作用。

在长期的演化过程中,昆虫适应了植物次生物质带来的种种不利作用,利用了各种有效的适应策略,用以保护自身不受伤害(朱麟和古德祥,2000)。致瘿现象是昆虫与植物之间的一种复杂联系的体现(Shorthouse *et al.*, 2005)。多数观点认为,致瘿昆虫是主要获利者,它们从植物中获得丰富的食物和具有良好保护作用的栖息地(王光钺等,2010)。然而,也有研究表明,虫瘿组织中丰富的酚类物质可能与寄主植物抵御致瘿昆虫有关(Westphal *et al.*, 1981; Abrahamson *et al.*,1991; Hartley, 1998)。本研究认为,肚倍内的高单宁环境对肚倍蚜产生了一定的氧化胁迫作用。肚倍蚜依靠体内的总抗氧化能力、SOD、CAT、POD 和 GST 活性提升以适应这种复杂环境。

## 参考文献(References)


Abrahamson WG, McCrea KD, Whitwell AJ, Vernieri LA, 1991. The role of phenolics in goldenrod ball gall resistance and formation. *Biochem. Syst. Ecol.*, 19(8):615—622.

Ahmad S, 1992. Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem. Syst. Ecol.*, 20(4):269—296.

Ahmad S, Duval DL, Weinhold LC, Pardini RS, 1991. Cabbage looper antioxidant enzymes: Tissue specificity. *Insect Biochem.*, 21(5):563—572.

Ahmad S, Pardini RS, 1990. Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free. Radical. Biol. Med.*, 8(4):401—413.

Barbehenn R, Cheek S, Gasperut A, Lister E, Maben R, 2005. Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. *J. Chem. Ecol.*, 31(5):969—988.

Barbehenn R, Weir Q, Salminen JP, 2008. Oxidation of ingested phenolics in the tree-feeding caterpillar *Orgyia leucostigma* depends on foliar chemical composition. *J. Chem. Ecol.*, 34(6):748—756.

Bi J, Felton G, 1995. Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *J. Chem. Ecol.*, 21(10):1511—1530.

Bi JL, Felton GW, Murphy JB, Howles PA, Dixon RA, Lamb CJ, 1997. Do plant phenolics confer resistance to specialist and generalist insect herbivores? *J. Agr. Food. Chem.*, 45(11):4500—4504.

Dreyer DL, Jones KC, Molyneux RJ, 1985. Feeding deterrency of some pyrrolizidine, indolizidine, and quinolizidine alkaloids towards pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) and evidence for phloem transport of indolizidine alkaloid swainsonine. *J. Chem. Ecol.*, 11(8): 1045—1051.

Feeny P, 1968. Effect of oak leaf tannins on larval growth of the winter moth *Operophtera brumata*. *J. Insect Physiol.*, 14(6):805—817.

Feeny P, 1970. Seasonal changes in oak leaf tannins and

nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, 51(4):565—581.

Felton GW, Summers CB, 1995. Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29:187—197.

Gross EM, Brune A, Walenciak O, 2008. Gut pH, redox conditions and oxygen levels in an aquatic caterpillar: Potential effects on the fate of ingested tannins. *J. Insect Physiol.*, 54(2):462—471.

Hartley SE, 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia*, 113(4):492—501.

Hernes PJ, Hedges JI, 2000. Determination of condensed tannin monomers in environmental samples by capillary gas chromatography of acid depolymerization extracts. *Anal. Chem.*, 72(20):5115—5124.

Krishnan N, Kodrík D, 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *J. Insect Physiol.*, 52(1):11—20.

赖永祺, 张燕平, 李正洪, 方英, 陈宝珊, 1992. 肚倍蚜生物学研究 Ⅰ 生活史. 林业科学研究, (5):554—558.

李志国, 杨文云, 夏定久, 2003. 中国五倍子研究现状. 林业科学研究,(6):760—767.

Miles PW, 1999. Aphid saliva. *Biol. Rev.*, 74(1):41—85.

Miles PW, Oertli J, 1993. The significance of antioxidants in the aphid-plant interaction:The redox hypothesis. *Entomol. Exp. Appl.*, 67(3):275—283.

Molyneux RJ, Campbell BC, Dreyer DL, 1990. Honeydew analysis for detecting phloem transport of plant natural products. *J. Chem. Ecol.*, 16(6):1899—1909.

Park CG, Lee KC, Lee DW, Choo HY, Albert PJ, 2004. Effects of purified persimmon tannin and tannic acid on survival and reproduction of bean bug, *Riptortus clavatus*. *J. Chem. Ecol.*, 30:2269—2283.

Peng Z, Miles PW, 1988. Acceptability of catechin and its oxidative condensation products to the rose aphid, *Macrosiphum rosae*. *Entomol. Exp. Appl.*, 47(3):255—265.

Peric MV, Blagojevic D, Spasic MB, Ivanovic J, Jankovic-Hladni M, 1997. Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of different population origins. *J. Insect Physiol.*, 43(1):101—106.

Pritsos CA, Ahmad S, Bowen SM, Elliott AJ, Blomquist GJ, Pardini RS, 1988. Antioxidant enzymes of the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*, and their response to the prooxidant allelochemical, quercetin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 8(2):101—112.

Shorthouse JD, Wool D, Raman A, 2005, Gall-inducing insects-Nature's most sophisticated herbivores. *Basic. Appl. Ecol.*, 6(5):407—411.

Summers CB, Felton GW, 1994. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): Potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect. Biochem. Molec.*, 24(9):943—953.

Tjallingii WF, 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J. Exp. Bot.*, 57(4):739—745.

Urbanska A, Tjallingii WF, Dixon AFG, Leszczynski B, 1998. Phenol oxidising enzymes in the grain aphid's saliva. *Entomol. Exp. Appl.*, 86(2):197—203.

王光钺, 王义平, 吴鸿, 2010. 虫瘿与致瘿昆虫. 昆虫知识, 47(2):414—424.

Wang Y, Oberley LW, Murhammer DW, 2001. Antioxidant defense systems of two lipidopteran insect cell lines. *Free. Radical. Biol. Med.*, 30(11):1254—1262.

Westphal E, Bronner R, Ret ML, 1981. Changes in leaves of susceptible and resistant *Solanum dulcamara* infested by the gall mite *Eriophyes cladophthirus* (Acarina, Eriophyoidea). *Can. J. Bot.*, 59(5):875—882.

Yack JE, 1993. Janus green B as a rapid, vital stain for peripheral nerves and chordotonal organs in insects. *J. Neurosci. Meth.*, 49:17—22.

朱麟, 古德祥, 2000. 昆虫对植物次生性物质的适应策略. 生态学杂志, (3):36—45.