

低温胁迫对西花蓟马抗氧化酶活性的影响^{*}

史 亮¹ 李鸿波¹ 金学柱² 王建军¹ 杜予州^{1**}

(1. 扬州大学应用昆虫研究所 扬州 225009; 2. 金日成综合大学 平壤 999093)

摘 要 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 是一种重要入侵害虫。温度是影响西花蓟马生长发育和繁殖的一个重要非生物因子, 西花蓟马对温度的耐受性决定了它的越冬存活率和地理分布。本文研究了 4 种抗氧化酶在低温胁迫下的活力变化。结果表明, 4 种抗氧化酶对低温胁迫具有不同的响应模式。低温处理能显著提高 SOD 的活力, 对 POD 的活力则具有明显的抑制作用; 然而, CAT 和 GST 的活力在低温胁迫处理表现为先降低, 随后逐渐提高的趋势。本研究结果表明 4 种抗氧化酶在西花蓟马应对低温胁迫中具有重要作用。

关键词 西花蓟马, 抗氧化酶, 低温胁迫

Effect of low temperature stress on antioxidant activity of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*

SHI Liang¹ LI Hong-Bo¹ KIM Hak Ju² WANG Jian-Jun¹ DU Yu-Zhou^{1**}

(1. Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. KIM IL SUNG University, Pyongyang, DPRK)

Abstract The western flower thrip (WFT), *Frankliniella occidentalis* (Pergande) is a key invasive insect. Temperature is one of the most important abiotic factors affecting the winter survival rate and geographical distribution of WFT. We studied the activities of four antioxidant enzymes under low temperature stress. We found that these four antioxidant enzymes exhibited different responses in relation to low temperature stress. Low temperature can significantly improve the activity of SOD, but suppress the activity of POD. However, the activities of CAT and GST first decreased, then increased, in response to low temperature. Our results thus indicate that these four antioxidant enzymes may play an important role in WFT's response to low temperature stress.

Key words *Frankliniella occidentalis*, antioxidant enzymes, low temperature stress

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 是蔬菜、花卉等植物上的重要害虫, 已在 69 个国家和地区报道该虫的发生危害, 其中在美国、荷兰、英国、西班牙、以色列等 14 个国家分布广泛、危害严重, 并已成为一种世界性的重要园艺作物害虫 (Kirk and Terry, 2003)。我国 2003 年 7 月首次报道该虫在北京郊区的部分保护地辣椒和黄瓜上危害, 通过初步调查研究后发现, 这种危险性的外来入侵害虫已在我国成功定殖 (张友军等, 2003)。目前, 该虫在我国北京、云南、贵州、浙江、江苏、河南、山东、辽宁、天津、湖南、新疆等地发生危害, 并呈现进一步扩散蔓延的趋势 (吴青君等, 2007; 郑长英等, 2007; 袁成明等, 2008; 刘佳等,

2010; 严丹侃等, 2010; 杨华等, 2010; 吕要斌等, 2011)。

温度是决定昆虫分布与扩散的一个重要因子。冬季的低温是影响昆虫存活是直接障碍 (McDonald *et al.*, 2000)。我们的研究发现, 西花蓟马能够在短小时内忍耐 -10℃ 的低温 (Li *et al.*, 2011; 李鸿波等, 2011), 这表明该虫具有较强的低温耐受能力, 但西花蓟马抵御低温伤害的机制至今还未见报道。抗氧化酶系统是几种抗氧化酶的总称, 其主要包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 过氧化物酶 (peroxidase, POD), 过氧化氢酶 (catalase, CAT), 谷胱甘肽巯基转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 等。当生物体受

* 资助项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103026, 200803025)。

** 通讯作者, E-mail: yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期: 2012-06-26, 接受日期: 2012-08-23

到环境胁迫后其活力会发生改变,以清除或分解体内的有毒物质,从而使生物体免受伤害。为此,本研究测定了西花蓟马 4 种抗氧化物酶在低温胁迫下的活力变化,以阐明西花蓟马耐低温的生理机制。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

西花蓟马种群于 2008 年 9 月取自浙江省农业科学院,在室内用四季豆豆荚进行多代饲养后备用。室内饲养在 RXZ 型智能人工气候箱(宁波江南仪器厂)中进行,温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$,湿度为 70% ~ 80%,光暗比为 16:8,实验中所用虫体为西花蓟马的 2 龄若虫。

1.2 化学试剂及仪器

1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)(98%,上海生工生物工程有限公司,化学纯), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (99%,国药集团化学试剂有限公司,化学纯), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99%,国药集团化学试剂有限公司,化学纯),还原型谷胱甘肽(GSH)(98.%,上海蓝季科技发展有限公司),牛血清白蛋白(BAS)(上海蓝季科技发展有限公司),考马斯亮蓝 G-250(国药集团化学试剂有限公司),美国 Bio-Tek 宝特全波长酶标仪(型号:Power wave XS),751 型分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)。

1.3 供试昆虫低温处理

根据 Li 等(2011)的实验结果,取室内饲养的西花蓟马 2 龄若虫约 120 头,分别于 26(对照)、0、-2、-4、-6、-8 和 -10°C 下处理 2 h,处理结束后置于 26°C 的人工气候箱中恢复 2 h,然后取处理的活虫 60 头放入 1.5 mL 的离心管,迅速放入液氮中,最后置于 -80°C 超低温冰箱中备用。以上处理中检查西花蓟马存活的标准为:用毛笔轻轻刺激虫体,若能正常爬行则视为其存活;否则,认为死亡。每个温度处理重复 4 次。

1.4 粗酶液的提取

取处理后试虫 60 头放入 1.5 mL 离心管中,加入 50 mL 预冷的、 $\text{pH } 7.5$ 、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液,于冰盒上用玻璃研磨棒研磨,加 450 mL 缓冲液冲洗研磨棒,然后于 4°C 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min。离心结束后取上清液即酶液,用于测定蛋白质含量以及抗氧化酶活力。每处理重复 4

次。

1.5 标准曲线的测定

称取 10 mg 牛血清白蛋白于小烧杯中,加蒸馏水使其完全溶解,将其转移至 100 mL 的容量瓶中,并把烧杯多冲洗几次,然后定容。取 6 只试管,分别加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 配制好的牛血清白蛋白溶液,在分别加入 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0 mL 蒸馏水,然后在每个试管中加入考马斯亮蓝 5.0 mL,对照管不加酶液。每个体系设 3 个重复。2 min 后,在 595 nm 下比色,以牛血清白蛋白含量为横坐标,OD 值为纵坐标,绘出标准曲线。

1.6 抗氧化酶活性的测定

西花蓟马 4 种抗氧化酶的活性测定均参照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行。

1.6.1 超氧化物歧化酶(SOD)测定 用 0.85% 的生理盐水 50 μL 进行匀浆,然后再用 450 μL 生理盐水进行冲洗, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 匀浆 10 min。离心结束后取上清液,根据说明书添加试剂,混匀,室温放置 10 min,于波长 550 nm 测吸光度值。总 SOD 酶活力计算公式如下:

$$\text{总 SOD 活力} = \frac{\text{对照吸光度} - \text{测定吸光度}}{\text{对照吸光度}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}} \div \text{粗酶液蛋白质含量。}$$

D 的活力定义: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 量一个活力单位(U)。式中 SOD 活力单位为 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$,粗酶液蛋白含量单位为 $\text{mg prot} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.6.2 过氧化氢酶(CAT)测定 按照测定 SOD 的方法收集上清液,然后根据说明书添加试剂,混匀,于波长 405 nm 处测定其吸光度值。CAT 酶活力计算公式如下:

$$\text{组织匀浆 CAT 活力} = (\text{对照管 OD} - \text{测定管 OD}) \times 271 \times \frac{1}{60 \times \text{取样量}} \div \text{测定样本匀浆蛋白质含量。}$$

CAT 活力定义:每毫克组织蛋白每分钟分解 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 的量为一个活力单位。式中 CAT 活力单位为 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$,粗酶液蛋白含量单位为 $\text{mg prot} \cdot \text{mL}^{-1}$,271 为斜率的倒数,60 表示在 37°C 下反应的时间,单位为 s。

1.6.3 过氧化物酶(POD)测定 按照测定 SOD 的方法收集上清液,然后按照试剂盒加入相应试剂,混匀后,3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液于 420 nm 处测定吸光值。POD 酶活力计算公式如下:

$$\text{POD 活力} = \frac{\text{测定 OD} - \text{空白 OD}}{12 \times \text{比色皿}(1.0 \text{ cm})} \times$$

$\frac{\text{反应液总体积}(\text{mL})}{\text{取样量}(\text{mL})} \div \text{反应时间} \div 10\% \text{ 组织匀浆蛋白} \times 1\,000。$

POD 活力定义:在 37℃ 下,每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 的底物的酶量为一个酶活力单位。式中 POD 活力单位为 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ prot}$,粗酶液蛋白质含量单位为 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,10% 为组织匀浆蛋白的浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),反应时间为 30 min。

1.6.4 谷胱甘肽 S-转移酶(GST)测定 参照 Habig 等(1974)的方法略有改动,以 2,4-二硝基氯苯为底物。在酶标板中依次加入 100 μL 酶液,180 μL 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CDNB 和 100 μL 12.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GSH(用 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.5 缓冲液稀释)。于 340 nm 波长下连续读数 21 次 20 min。每处理重复 4 次。以时间和光密度值作图,求出线性部分的斜率,即以反应的初速度为酶活力。测定工作酶液蛋白质含量,计算 GSTs 的比活力。

1.7 数据处理

采用 Excel 2003 和 DPS v7.05 对数据进行统计处理,运用 Tukey 法对不同温度处理后西花蓟马抗氧化酶活力进行多重比较,显著性水平取 $P = 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 低温对若虫超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

西花蓟马若虫在零下低温处理 2 h 后 SOD 活性如图 1(A)所示,低温胁迫对西花蓟马 SOD 活力具有显著影响($F = 1.66$; $df = 6, 27$; $P < 0.001$)。在 0℃ 至 -8℃ 范围内,SOD 活力与对照相比差异不显著,在 -10℃ 下,SOD 活力最高,与对照相比差异显著。

2.2 低温对若虫过氧化物酶(POD)活性的影响

西花蓟马若虫在零下低温处理 2 h POD 活性如图 1(B)所示,低温处理对 POD 活力具有显著影

响($F = 109.65$; $df = 6, 27$; $P < 0.001$)。经低温处理后 POD 的活力明显下降,在 -2℃ 时达最小值。随着温度的持续下降,其活力有所上升,但均明显低于对照。

2.3 低温对若虫过氧化氢酶(CAT)活性的影响

西花蓟马若虫在零下低温处理 2 h 后 CAT 活性如图 1(C)所示,低温处理对 CAT 的活力具有明显影响($F = 299.89$; $df = 6, 27$; $P < 0.001$)。与对照相比,CAT 的活力在 0℃ 和 -2℃ 时并未明显降低,但在 -4℃ 下其活力降至最低。随着温度的降低,CAT 活力逐渐升高,至 -10℃ 达到最大值,并明显高于对照。

2.4 低温对若虫谷胱甘肽巯基转移酶(GST)活性的影响

西花蓟马若虫在零下低温处理 2 h 后 GST 活性如图 1(D)所示,低温胁迫对西花蓟马 GST 活力具有显著影响($F = 4\,073.23$; $df = 6, 27$; $P < 0.001$)。0℃ 和 2℃ 的低温处理对 GST 的活力具有明显的抑制作用,但随着温度的降低,GST 活力逐渐升高,且与对照相比差异显著。

3 讨论

昆虫作为典型的变温动物,对环境温度具有强烈的依赖性。任何环境温度的变化会引起昆虫体内一系列的生理响应,同时这种胁迫反应的发生伴随着活性氧的产生,从而导致氧化损伤。活性氧 ROS 是生物体氧化代谢中产生的代谢产物,主要包括超氧阴离子自由基(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基(OH^-),以及由此产生的有机过氧化物自由基(RO^- 、 ROO^-)和氢过氧化物 ROOH 等(Livingstone, 2001; Marnett and West, 2003; Dubovskii *et al.*, 2010)。这种活性氧是涉及电子传递的生化过程中的一种正常的代谢产物,但它必须及时地被除去,以维持一个低水平的动态平衡,才不会对机体造成伤害。为此,昆虫在长期的进化过程,形成了一系列的策略来减轻或避免 ROS 产生带来的伤害,如小分子物质的积累,抗氧化系统的形成以及一些胁迫蛋白的表达等。为了阐明抗氧化系统在西花蓟马抵御低温胁迫过程中的作用,本研究测定了低温胁迫对 4 种抗氧化酶 SOD、POD、CAT 和 GST 活力变化的影响。结果表明经低温胁迫 4 种抗氧化酶的活力具有显著影

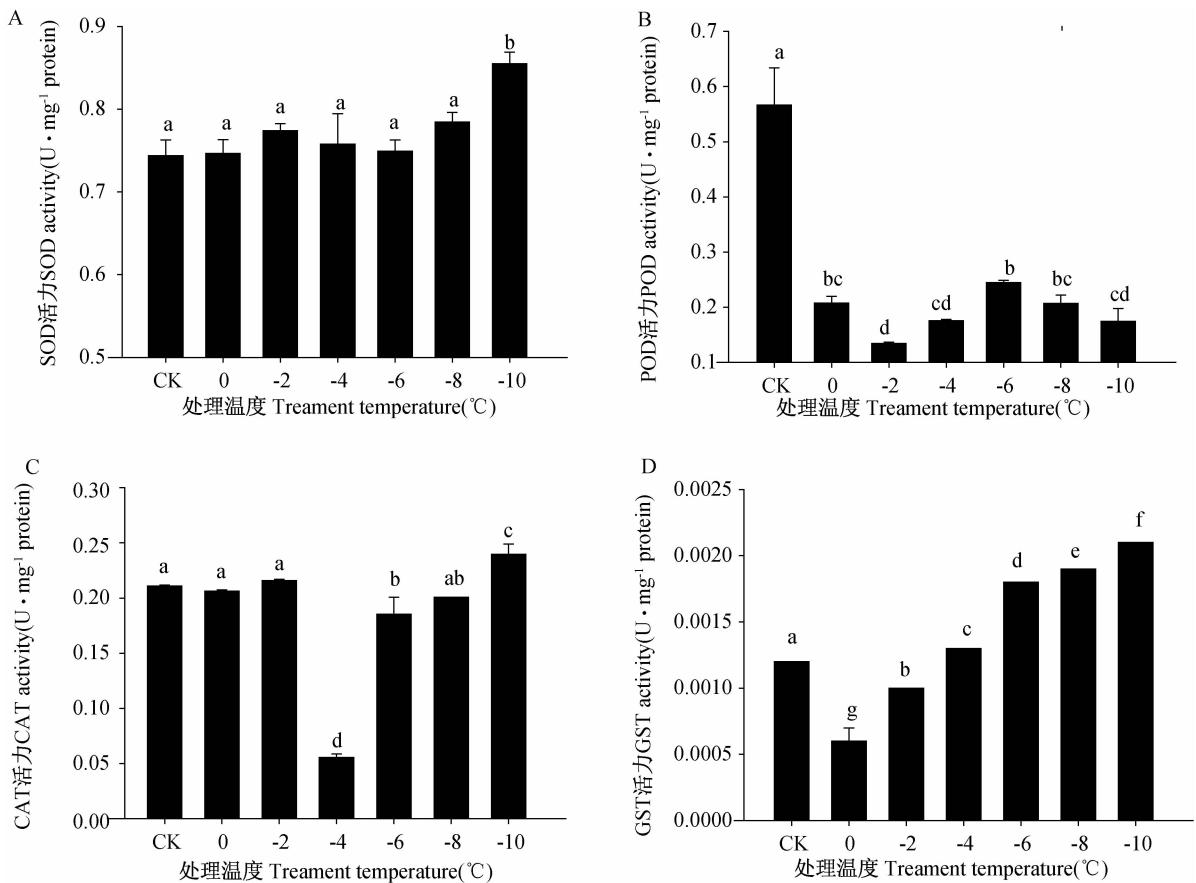


图1 低温胁迫对西花蓟马4种抗氧化酶活性的影响

Fig.1 Effect of low temperature stress on the activities of four antioxidant enzymes in western flower thrips

图中数值为平均值±标准误,柱上标有不同字母表示在0.05水平上差异显著。A、B、C、D分别表示经低温处理后西花蓟马SOD、POD、CAT和GST的酶活力。

Data is presented as means ± SE, histograms with different letters show significant difference at 0.05 level. A, B, C and D stand for the activity of SOD, POD, CAT and GST after WFT were exposed to low temperature, respectively.

响,这暗示4种抗氧化酶在西花蓟马抵御低温胁迫过程中可能具有重要作用。

SOD作为重要的抗氧化酶能够降低超氧自由基的水平(Park *et al.*, 2009),将超氧化物阴离子自由基(O₂⁻)快速歧化为过氧化氢(H₂O₂)和分子氧(O₂)。本研究表明,低温处理2 h后,SOD活力与对照相比明显提高,说明低温胁迫诱导了SOD活性的升高,分解氧化反应产生的超氧阴离子,从而使西花蓟马减轻或避免低温胁迫带来的伤害。先前的研究报道了低温胁迫引起的氧化反应能够导致抗氧化酶活性的升高,如杨丽红(2011)发现柑橘全爪螨SOD的活力随着温度的下降活力逐渐提高,并在0℃达到最大值,这与本研究的结果相似。

CAT的主要作用是将SOD产生的过氧化氢

分解成水和氧气(2H₂O₂→2H₂O + O₂)(Kashiwagi *et al.*, 1997),而POD则是在低浓度时分解过氧化氢(Ahmad and Pardini, 2008),二者共同作用将H₂O₂维持在较低的水平。本研究发现随着温度降低CAT的活力逐渐降低,并在-4℃达到最低值;然而随着温度的继续降低其活力开始逐渐升高,并在-10℃达到最大值。这种趋势可以解释为,0~4℃的低温对CAT的活力起抑制作用,并未诱导抗氧化反应的产生。然而,随着温度的继续降低,CAT活力逐渐升高,说明此时的低温胁迫诱导了抗氧化反应的产生,从而分解H₂O₂。经低温胁迫处理后,POD的活力明显的下降,说明POD也参与了抗氧化反应,在低浓度时分解H₂O₂。相似的结果在东方实蝇中也有发现(Jia *et al.*, 2011),而与柑橘全爪螨的研究结果不符,对后者的研究表

明 CAT 和 POD 并不参与过氧化反应(杨丽红, 2010)。此外,有研究表明,在一些物种体内还存在一种 GPx 的同系物,它也能分解 H_2O_2 (Li *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2008)。

GST 的主要作用是通过代谢脂质过氧化物以降低 ROS 的产生(Kono and Shishido, 1992; Claravon-Mathews *et al.*, 1997),被认为是评价生物体对环境胁迫产生过氧化反应的重要标记(Monteiro *et al.*, 2006)。低温胁迫对西花蓟马 GST 活力先是表现出抑制作用,但随着温度的持续降低,其活力逐渐增强,这表明低温胁迫导致西花蓟马体内脂质过氧化物的积累,诱导了 GST 的活力提高,从而使西花蓟马免受氧化反应带来的伤害;同时,这一结果与对两种鳞翅目昆虫的研究结果相似(Wang *et al.*, 2001)。

综上所述,低温胁迫诱导了西花蓟马产生过氧化反应。在低温胁迫下,SOD 和 GST 能够减少 ROS 的产生,而 CAT 和 POD 则能分解 SOD 产生的 H_2O_2 。因此,4 种抗氧化酶相互作用,共同保护西花蓟马体内氧化还原反应的平衡,使其能够有效的抵御低温的伤害。需要指出的是,昆虫抵御低温的机制是一个复杂的系统,因此要系统阐明西花蓟马耐低温的生理机制,尚需进一步的研究。

参考文献 (References)

- Ahmad S, Pardini RS, 2008. Antioxidant defense of the cabbage looper. *Trichoplusiani*; enzymatic responses to the superoxide-generating flavonoid, quercetin, and photodynamic furanocoumarin, xanthotoxin. *Photochem. Photobiol.*, 51(3):305–311.
- Claravon-Mathews M, Summers CB, Felton GW, 1997. Ascorbate peroxidase; a novel antioxidant enzyme in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 34(1):57–68.
- Dubovskii IM, Grizanov EV, Chertkova EA, 2010. Generation of reactive oxygen species and activity of antioxidants in hemolymph of the moth larvae *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) at development of the process of encapsulation. *J. Evol. Biochem. Phys.*, 46(1):35–43.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974. Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.*, 249:7130–7139.
- Jia FX, Dou W, Hu F, Wang JJ, 2011. Effects of thermal stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.*, 94(4):956–963.
- Kashiwagi A, Kashiwagi K, Takase M, Hanada H, Nakamura M, 1997. Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 118:499–503.
- Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agr. Forest Entomol.*, 5(4):301–310.
- Kono Y, Shishido T, 1992. Distribution of glutathione S-transferase activity in insect tissues. *Appl. Entomol. Zool.*, 27:391–397.
- Li D, Blasevich F, Theopold U, Schmidt O, 2003. Possible function of two insect phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidases. *J. Insect. Physiol.*, 49(1):1–9.
- Li HB, Shi L, Lu MX, Wang JJ, Du YZ, 2011. Thermal tolerance of *Frankliniella occidentalis*: Effects of temperature, exposure time, and gender. *J. Therm. Biol.*, 36(7):437–442.
- Livingstone D, 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42(8):656–666.
- Marnett L, West J, 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.*, 111(5):583–593.
- McDonald JR, Head J, Bale JS, 2000. Cold tolerance, overwintering and establishment potential of *Thrips palmi*. *Physiol. Entomol.*, 25(2):159–166.
- Monteiro DA, Almeida JAD, Rantin FT, Kalinin AL, 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 143(2):141–149.
- Park H, Aah IY, Park KI, Hyun S, 2008. Response of antioxidant defence systems to thermal stress in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Antarct. Sci.*, 20(6):521–526.
- Park MS, Jo PG, Choi YK, An KW, Choi CY, 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.*, 5:453–463.
- Wang Y, Oberley LW, Murhammer DW, 2001. Antioxidant defense systems of two lepidopteran insect cell lines. *Free Rad. Biol. Med.*, 30:1254–1262.
- 李鸿波, 史亮, 王建军, 杜予州, 2011. 西花蓟马的快速冷驯化及其生态学代价. *生态学报*, 31(23):7196–7202.
- 刘佳, 张林, 卢焰梅, 张宏瑞, 2010. 湖南外来入侵害虫

西花蓟马初步调查. 安徽农业科学, 38(25):13800 - 13804.

吕要斌, 张志军, 吴青君, 杜予州, 张宏瑞, 于毅, 王恩东, 王鸣华, 王满囤, 童晓立, 吕利华, 谭新球, 付卫东, 2011. 外来入侵害虫西花蓟马防控技术与示范. 应用昆虫学报, 48(3):488 - 496.

吴青君, 徐宝云, 张治军, 张友军, 朱国仁, 2007. 京、浙、滇地区植物蓟马种类分布及其调查. 中国植保导刊, 27(1):32 - 34.

严丹侃, 汤云霞, 贺子义, 孙雷, 王鸣华, 薛晓峰, 范加勤, 2010. 南京地区西花蓟马发生调查及其分子检测. 南京农业大学学报, 33(4):59 - 63.

杨华, 崔元珩, 张升, 孙晓军, 2010. 来入侵害虫 - 西花蓟马在新疆的发生为害. 疆农业科学, 47(11):52 - 53.

杨丽红, 2011. 柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (McGregor) 对热胁迫的响应机制研究. 博士学位论文. 重庆:西南大学.

袁成明, 鄧军锐, 李景柱, 张勇, 2008. 贵州省蔬菜蓟马种类调查研究. 中国植保导刊, 28(7):8 - 10.

张友军, 吴青君, 徐宝云, 朱国仁, 2003. 危险性外来入侵生物——西花蓟马在北京发生危害. 植物保护, 29(4):58 - 59.

郑长英, 刘云虹, 张乃芹, 赵希丽, 2007. 山东省发现外来入侵有害生物——西花蓟马. 青岛农业大学学报(自然科学版), 24(3):172 - 174.