研究论文

CO_2 浓度升高对粘虫幼虫体内酶活性的影响*

陈晓燕[1**] 李永川[2] 郝若诗[3] 可 芮[1] 李亚红[2]
杨学存[1] 桂富荣[1, 3***]

（1. 云南农业大学植物保护学院，农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室，昆明 650201；
2. 云南省植保植检站，昆明 650034；3. 云南省高原特色农业产业研究院，昆明 650201）

摘 要 **【目的】** 阐明大气 CO_2 浓度升高对粘虫 *Mythimna separata* (Walker)幼虫不同龄期体内酶活性的影响机制。**【方法】** 测定分析了人工气候箱内不同 CO_2 浓度（800 μL/L 和 400 μL/L）条件下，粘虫幼虫体内 4 种解毒酶[羧酸酯酶（CarE）、乙酰胆碱酯酶（AchE）、微粒体多功能氧化酶（MFO）和谷胱甘肽-*S*-转移酶（GST）]、3 种保护酶[超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）和过氧化氢酶（CAT）]和 4 种蛋白酶（总蛋白酶、强碱性类胰蛋白酶、弱碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶）活性的变化。**【结果】** （1）粘虫不同龄期幼虫体内 4 种解毒酶的活力均随着 CO_2 浓度升高而显著上升（P<0.05）；（2）粘虫幼虫体内的保护酶中 SOD 酶活性在 CO_2 浓度为 800 μL/L 条件下低于对照（CO_2 浓度为 400 μL/L）条件下的酶活性，其中 4 至 6 龄幼虫的下降趋势较为显著（P<0.05），而 POD、CAT 酶活性均呈上升趋势，800 μL/L 浓度下的 CAT 活力均显著高于对照（P<0.05）；（3）高 CO_2 浓度条件下粘虫总蛋白酶的酶活性随着龄期的增加呈现先上升后下降的趋势，强碱/弱碱性类胰蛋白和类胰凝乳蛋白 3 种酶的比活力均低于 400 μL/L CO_2 浓度下的比活力，其中类胰凝乳蛋白酶比活力显著低于对照条件下的比活力（P<0.05）。**【结论】** 在高 CO_2 浓度条件下，粘虫幼虫体内的大多数酶系活力呈现下降趋势，大部分解毒酶和蛋白酶活性受到抑制，SOD、CAT 和 POD 3 种保护酶的动态平衡受到干扰而影响其正常的生理代谢，机体受损伤并随龄期的增加而加重。

关键词 粘虫，不同龄期幼虫，CO_2 浓度，解毒酶，保护酶，蛋白酶

Effects of elevated CO_2 concentration on enzyme activity of oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae

CHEN Xiao-Yan[1**] LI Yong-Chuan[2] HAO Ruo-Shi[3] KE Rui[1] LI Ya-Hong[2]
YANG Xue-Cun[1] GUI Fu-Rong[1, 3***]

(1. Key Laboratory for Agricultural Biodiversity and Pest Management of Ministry of Education, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Yunnan Plant Protection Station, Kunming 650034, China; 3. Yunnan Plateau Characteristic Agriculture Industry Research Institute, Kunming 650201, China)

Abstract **[Objectives]** To determine the enzymatic response of different larval instars of the armyworm (*Mythimna separata* (Walker)) to elevated atmospheric CO_2 concentration. **[Methods]** The activity of detoxifying, protective, and protease, enzymes in different larval instars were measured under different atmospheric CO_2 concentrations (800 μL/L and 400 μL/L) in an artificial climate chamber. **[Results]** (1) The activity of four detoxifying enzymes increased significantly in

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31260450，30860069）；云南省科技人才培养计划项目（2013HB072）；云南省科技创新团队计划项目（2011HC005）

**第一作者 First author，E-mail：cxy_05@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：E-mail：furonggui18@sina.com

收稿日期 Received：2015-12-03，接受日期 Accepted：2016-03-22

different instars at higher CO_2 concentrations (P<0.05). (2) Superoxide dismutase (SOD) activity tended to decline at a CO_2 concentration of 800 μL/L, especially in fourth to sixth instar larvae (P<0.05). Peroxidase (POD) and catalase (CAT) activity tended to increase at 800 μL/L CO_2 concentration, and CAT activity was significantly higher than that in the control at 400 μL/L CO_2 concentration (P<0.05). (3) At 800 μL/L CO_2 concentration, total protease activity increased with instar number and showed a rising, then falling, trend. Activity of the other three protease enzymes was lower than that at 400 μL/L concentration, and the activity of the chymotrypsin-like enzyme was significantly lower than in the control for all instars (P<0.05). **[Conclusion]** Most enzyme activity tended to decline at higher CO_2 concentrations; detoxifying and protease enzymes were suppressed, and the balance between SOD, CAT and POD was disrupted, disturbing the normal physiological metabolism. The resultant damage increased in successive instars.

Key words *Mythimna separata*, different instar, CO_2 concentration, detoxifying enzymes, protective enzymes, protease

近年来，大气 CO_2 浓度升高已成为全球备受关注的环境问题，工业革命以来，大气 CO_2 浓度持续升高，预计在本世纪末将达到目前的两倍水平（Intergovernmental Panel on Climate Change，2007）。CO_2 浓度的升高不仅影响了植物光合产物的分配，导致植物组织中碳水化合物的积累和氮浓度降低（Lindroth，2010），而且这些变化将影响植食性昆虫的食物质量和数量，进而影响其生物学特性和生理特征发生变化（Piskorski and Dorn，2011）。

解毒酶、保护酶和中肠蛋白酶是昆虫体内最主要的三大酶系，解毒酶对分解外源毒物、维持正常生理代谢起重要作用（Tiwari *et al.*，2011），其中羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶、微粒体多功能氧化酶和谷胱甘肽-*S*-转移酶是昆虫体内几种重要的解毒酶系。超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶是生物体内普遍存在的防御氧化损伤的重要保护酶，生物体内保护酶处于一种动态平衡状态，使自由基维持在一个低水平，相关研究表明昆虫体内的保护酶活性与昆虫对外界刺激物反应的强度有关（李周直，1994）。昆虫蛋白酶是中肠上皮细胞分泌的消化蛋白质和碳水化合物的重要酶，目前国内外的研究主要集中于杀虫蛋白对昆虫肠道中蛋白酶水平或类型的变化的研究（Heckel，1994；解娜等，2012）。

粘虫 *Mythimna separata* Walker 属于鳞翅目，夜蛾科，是我国禾本科作物上一种典型的季节性远距离迁飞危害的重大农业害虫，其啃食作物叶片，大面积暴发时农作物几乎被吃成光杆，轻则减产，重则绝收，严重威胁我国粮食作物的生产安全（张云慧等，2012；曾娟等，2013）。该虫在我国境内除新疆和西藏地区发生情况不明外，其他省份几乎均有粘虫的分布，且发生历史久远，危害损失严重。目前的研究主要集中于 Bt 杀虫蛋白对粘虫生长发育的影响及其对高龄幼虫体内酶活性、生长发育、繁殖及飞行能力的影响（蒋善军等，2010；解娜等，2012），而有关 CO_2 浓度对粘虫体内解毒酶、保护酶和蛋白酶活性的影响研究较少，本文通过人工气候箱内模拟实验研究 CO_2 浓度升高对不同龄期粘虫体内酶活性的影响，分析不同龄期幼虫体内酶活性的变化，研究结果不仅对未来气候变化条件下粘虫的发生与防治具有指导意义，而且对于揭示气候变化对昆虫的影响和指导农业生产具有一定的实际意义。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

虫源来自云南省普洱市宁洱县（101.13°E，23.16°N）田间灯光诱捕的迁入成虫，进行种类鉴定后，室内连续饲养 3 代以上建立稳定的实验种群，然后将粘虫分别放在室内 CO_2 人工光照培养箱（型号 SANY-1000，光周期 16L∶8D，温度（25±1）℃，相对湿度 70%±5%，CO_2 浓度分别为（400±20）μL/L 和（800±20）μL/L）中。不同 CO_2 浓度处理，取不同龄期幼虫 20 头，每次处理重复 3 次，共在 9 个人工气候箱进行，同时对粘虫人工饲料（公布号：CN101856085A）加以改进后进行室内饲养。主要饲养过程为：挑取

初孵幼虫，在放有人工饲料的 12 孔细胞培养板（CrystalGen 公司）中单孔单头饲养至 6 龄，然后移入 6 孔细胞培养板中继续单孔单头饲养，幼虫化蛹 2 d 后，将蛹集中移入养虫笼（55 cm×55 cm×55 cm）中，每日饲喂羽化成虫并更换 5%（v/v）蜂蜜水，直至产卵。

1.2 不同 CO_2 浓度下解毒酶活性的测定

1.2.1 解毒酶酶液的制备 1 龄、2 龄幼虫由于其虫体太小，无法解剖其中肠，因此取整头虫进行研磨，3 龄以上幼虫在 0~4℃预冷的蜡盘下迅速解剖，截取中肠及其内含物。不同龄期幼虫各取样 5~8 头，放入 5 mL 预冷的离心管中，加入 1 mL 的磷酸缓冲液（0.1 mol/L，pH 7.6），用高通量组织研磨器（MY-10）在冰浴中匀浆。匀浆液在 4℃下 10 000×g 离心 20 min，取上清液作为酶源，4℃冰箱中保存，24 h 内使用，每次处理重复 3 次。

1.2.2 解毒酶酶源蛋白质含量的测定 采用牛血清白蛋白（BSA）作蛋白标准曲线，取 200 μL 各处理下粘虫的待测酶液，加入 0.01%考马斯亮蓝 G-250 染色液 2.0 mL，充分混匀，静置 10 min，在分光光度计（UV-1800，美谱达公司）595 nm 处测定吸光值。将 OD 值带入上述蛋白标准曲线，求出酶原蛋白含量（mg/L），该测定方法主要参照 Bradford（1976）的考马斯亮蓝 G-250 染色法进行测定并稍作改进。

1.2.3 解毒酶活性的测定 CarE 活性的测定方法参照 Van Asperen（1962），并稍作修改。反应混合液含 10 μL 酶液、30 μL 毒扁豆碱（10^{-5} mol/L）、400 μL 的 α-乙酸奈脂（300 μmol/L）、560 μL 磷酸缓冲液（mol/L，pH 7.6）加入离心管中摇匀。37℃水浴 30 min 后，加入 100 μL 显色液：1%固蓝 B 与 5%十二烷基硫酸钠以 2∶5 的体积比混合，在室温下放置 10 min。于 600 nm 波长处的吸光值，并按产物生成量计算羧酸酯酶的活性。

AchE 活性测定方法参照高希武（1987）的方法，并稍作改进。该反应体系包括：10 μL 酶原液、0.9 mL 磷酸缓冲液（0.1 mol/L，pH 7.5）、100 μL 碘化乙酰硫代胆碱（5×10^{-4} mol/L）加入离心管中摇匀。37℃水浴 20 min 后，加入 1 mL 的 DTNB-磷酸乙醇显色剂，在室温下放置 10 min。于 412 nm 波长处的吸光值，并按产物生成量计算乙酰胆碱酯酶活性。

MFO 活性测定方法参照刘玉坤等（2011），并稍作改进。反应体系为：50 μL 对硝基苯甲醚（1.0 mmol/L）、100 μL 酶原液，加入离心管中摇匀。37℃水浴 5 min 后，加入 50 μL 还原型辅酶Ⅱ（1.0 mol/L），立即用分光光度计于 405 nm 波长处测定吸光值，并按产物生成量计算微粒体多功能氧化酶活性。

谷胱甘肽-*S*-转移酶活力测定：每 mg 组织蛋白，在 37℃反应 1 min 扣除非酶促反应，使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位。具体步骤按照南京建成生物工程公司试剂盒的说明进行检测。

1.3 不同 CO_2 浓度下保护酶活性的测定

1.3.1 保护酶酶液的制备 1 龄、2 龄幼虫由于其虫体太小，无法解剖其中肠，因此取整头虫进行研磨，3 龄以上幼虫在 0~4℃预冷的蜡盘下迅速解剖，截取中肠及其内含物。不同龄期幼虫各取样 5~8 头，放入预冷的 5 mL 预冷的离心管中，用 0~4℃预冷的蜡盘，将粘虫用昆虫针固定于蜡盘上，迅速解剖并截取中肠及其内含物，用预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液冲洗，称取中肠重量，按重量体积比（g/mL）1∶9 的比例加入生理盐水（0.4%），用研磨器在冰浴中匀浆，2 500×g 离心 10 min 后取上清作为待测酶液，待测酶液保存于 4℃冰箱中，24 h 内使用，每次处理重复 5 次。

1.3.2 保护酶酶源蛋白质含量的测定 保护酶酶源蛋白质含量的测定参照 Bradford（1976）考马斯亮蓝 G-250 染色法。

1.3.3 保护酶活性的测定 SOD，CAT 和 POD 活性测定参照史亮等（2013）的方法，并严格按照南京建成生物工程公司试剂盒的说明进行检测。

$$\text{总SOD活力}\ (\text{U/mg}\cdot\text{prot}) = \frac{\text{空白}OD\text{值}-\text{测定}OD\text{值}}{\text{空白}OD\text{值}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量（mL）}} \div \text{待测样本蛋白浓度}\ (\text{mg}\cdot\text{prot/mL})$$

$$\text{组织中CAT活力}\ (\text{U/mg}\cdot\text{prot}) = (\text{空白}OD\text{值} - \text{测定}OD\text{值}) \times 271 \times \frac{1}{60 \times \text{取样量}} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{(\text{mg}\cdot\text{prot/mL})},$$

$$\text{组织中POD活力}\ (\text{U/mg}\cdot\text{prot}) = \frac{\text{测定}OD\text{值} - \text{空白}OD\text{值}}{12 \times \text{比色光径（1 cm）}} \times \frac{\text{反应液总体积（mL）}}{\text{样本量（uL）}} \div \frac{\text{待测蛋白浓度}}{(\text{mg}\cdot\text{prot/mL})} \times 1\,000。$$

1.4　不同 CO_2 浓度下蛋白酶活性的测定

1.4.1　蛋白酶酶液的制备　除了待测酶液制备中离心速度为 15 000×g 离心 15 min 外，其余操作同 1.3.1 保护酶酶液的制备。

1.4.2　中肠总蛋白酶活性的测定　用氨苄磺胺偶氮酪蛋白作为底物，偶氮酪蛋白（20 mg/mL）溶于 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液，取 0.3 mL 该溶液加入 0.3 mL 含有中肠酶液的反应缓冲液（0.2 mol/L，pH 10.5 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液）中，在 30℃反应 2 h，加入 0.6 mL 的 20%（w/v）三氯乙酸终止反应。反应混合物在 15 000×g，4℃离心 15 min，取上清液，在 366 nm 测紫外吸光值，该测定方法主要参照王琛柱和钦俊德（1996）。

1.4.3　类胰蛋白酶活力测定　采用两种专性底物，强碱性类胰蛋白酶以 BAPNA 作为底物，弱碱性类胰蛋白酶以 TAME 作为底物。BAPNA 以 20 mg/mL 溶于二甲基亚砜，取 40 μL 加入 1.5 mL 含有中肠酶液的反应缓冲液（0.1 mol/L，pH 10.5 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液）中，20 min 后，加入 0.5 mL 30%（v/v）乙酸终止反应，用分光光度计在 406 nm 处测吸光值。TAME 以 2 mmol/L 溶于 0.15 mol/L NaCl 溶液中，在 248 nm 测定吸光值，反应缓冲液为 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液。

1.4.4　类胰凝乳蛋白酶活力测定　以 BTEE 为反应底物，BTEE 以 1 mmol/L 溶于含有 10%（v/v）甲醇的 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液中，取该液 0.5 mL 加入 0.5 mL 含有中肠缓冲液的反应缓冲液（0.2 mol/L，pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液），256 nm 处测定光吸收值。540、8800、964 分别为 TAME、BAPNA 和 BTEE 的克分子消光值，用以计算相应水解底物的摩尔数。

1.5　数据统计与分析

采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理，不同 CO_2 浓度下，同一龄期的酶活性差异比较采用独立样本 *t*-检验法进行差异显著性分析。

2　结果与分析

2.1　CO_2 浓度升高对粘虫体内解毒酶活性的影响

CO_2 浓度升高对粘虫不同龄期幼虫体内羧酸酯酶活性的影响如图 1 所示，两种 CO_2 浓度下，CarE 酶活性均随着粘虫龄期的增加而不断上升，800 μL/L CO_2 浓度下的粘虫 CarE 酶活性均比 400 μL/L 浓度下的粘虫 CarE 酶活性低，其中 1 至 3 龄和 6 龄幼虫 CarE 的活性与对照（400 μL/L CO_2 浓度）相比差异显著，1 龄与 3 龄幼虫与对照相比差异极显著（$P<0.05$），5 龄、6 龄幼虫差异不显著（$P>0.05$）。

800 μL/L CO_2 浓度下，粘虫 5 龄、6 龄幼虫乙酰胆碱酯酶（AchE）活性显著高于 400 μL/L CO_2 浓度下的粘虫 AchE 活性（$P<0.05$，图 1），6 龄幼虫达到极显著差异（$P<0.001$）而 1 龄至 4 龄的幼虫与对照条件下的相同龄期幼虫相比差异不显著（$P>0.05$）。AchE 在两种不同 CO_2 浓度下的活性表现为高浓度条件下的 1 龄、2 龄粘虫幼虫酶活性低于 400 μL/L CO_2 浓度下的对应龄期幼虫，随着龄期的不断增加，其活性逐渐高于 400 μL/L CO_2 浓度下的相应粘虫幼虫。

在高 CO_2 浓度条件（800 μL/L CO_2）下，粘虫不同龄期的幼虫体内微粒体多功能氧化酶（MFO）比活力呈现随龄期增加而逐渐上升的趋势，而低 CO_2 浓度（400 μL/L CO_2）下 MFO 的酶活性呈现先降后升趋势（图 1）。高 CO_2 浓度下，粘虫 4 龄、5 龄幼虫的 MFO 与对照相比达到显著差异，6 龄幼虫呈现极显著差异（$P<0.001$），4 龄至 6 龄幼虫与对照相比分别上升了 1.24%、1.38%和 1.25%。

两种 CO_2 浓度下，谷胱甘肽-*S*-转移酶（GSH-*S*-转移酶）的活力均呈现随着龄期的增长呈现逐渐下降的趋势（图 1），800 μL/L CO_2

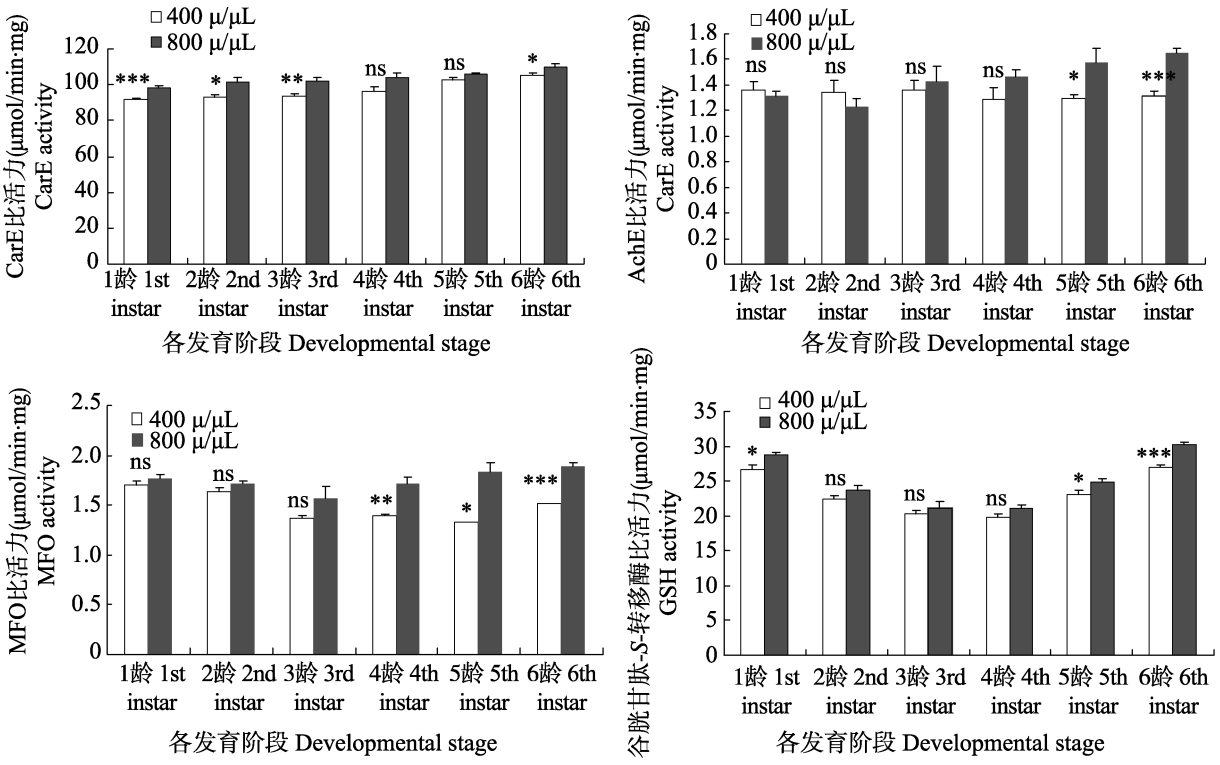


图 1　大气 CO_2 浓度升高对粘虫不同龄期幼虫体内解毒酶活性的影响

Fig. 1　Influence of elevated CO_2 concentration on detoxifying enzyme activities in different instar larvae of *Mythimna separata*

图中数值为平均数±标准误. *表示同一指标在 400 μL/L 和 800 μL/L 的 CO_2 浓度处理下经 *t*-检验差异显著（$P<0.05$），**表示 $P<0.01$，***表示 $P<0.001$，ns 表示差异不显著（$P>0.05$），图 2 同。

Data in the figure are mean±SE. * shows that there exists significant difference for the index between the CO_2 concentration of 400 μL/L and that of 800 μL/L by *t*-test ($P<0.05$), ** shows $P<0.01$, *** shows $P<0.001$. The same as the Fig. 2.

表 1　解毒酶活性独立样本 *t*-检验分析结果

Table 1　The result of detoxifying enzyme analysed by independent sample *t*-test

解毒酶 Detoxifying enzyme	1 龄幼虫 1st instar larva			2 龄幼虫 2nd instar larva			3 龄幼虫 3rd instar larva		
	t	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*
羧酸酯酶 CarE	5.892	16	0.000***	2.264	16	0.038*	3.142	16	0.006**
乙酰胆碱酯酶 AchE	0.331	13.742	0.745	0.724	16	0.479	0.018	13.058	0.986
微粒体多功能氧化酶 MFO	1.492	16	0.208	1.884	16	0.096	1.542	16	0.162
谷胱甘肽-*S*-转移酶 GSH	3.062	16	0.016*	1.964	16	0.091	0.724	16	0.490
	4 龄幼虫 4th instar larva			5 龄幼虫 5th instar larva			6 龄幼虫 6th instar larva		
	t	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*
羧酸酯酶 CarE	0.655	16	0.188	0.912	16	0.131	2.924	16	0.010*
乙酰胆碱酯酶 AchE	1.383	16	0.186	2.120	8.765	0.050*	7.416	8.158	＜0.001***
微粒体多功能氧化酶 MFO	4.901	16	0.003**	3.099	16	0.036*	13.408	16	＜0.001***
谷胱甘肽-S-转移酶 GSH	1.944	16	0.088	2.405	16	0.043*	5.701	16	＜0.001***

* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$。表 2 和 4 同。The same with Table 2 and Table 4.

浓度下，不同龄期粘虫幼虫体内的 GSH-*S*-转移酶酶活力均高于对照，其中 1 龄和 5 龄幼虫的 GSH-*S*-转移酶与对照相比达到显著差异（$P<0.05$），6 龄幼虫达极显著差异水平（$P<0.001$）。

2.2　CO_2 浓度升高对粘虫体内保护酶活性的影响

随着 CO_2 浓度的升高，不同龄期幼虫粘虫体内超氧化物歧化酶（SOD）活性呈明显下降趋势（图 2），1 龄至 2 龄幼虫略高于对照，但无显著差异（$P>0.05$），4 龄幼虫以后均显著低于对照，5 龄、6 龄幼虫呈极显著差异（$P<0.001$），分别比 400 μL/L CO_2 浓度下的对应粘虫幼虫 SOD 酶活性降低了 0.80%、0.64%和 0.56%。

粘虫不同龄期幼虫在不同 CO_2 浓度下，其体内过氧化物酶（POD）活性整体呈先上升后下降的趋势（图 2），1 龄、2 龄幼虫的 POD 活性与

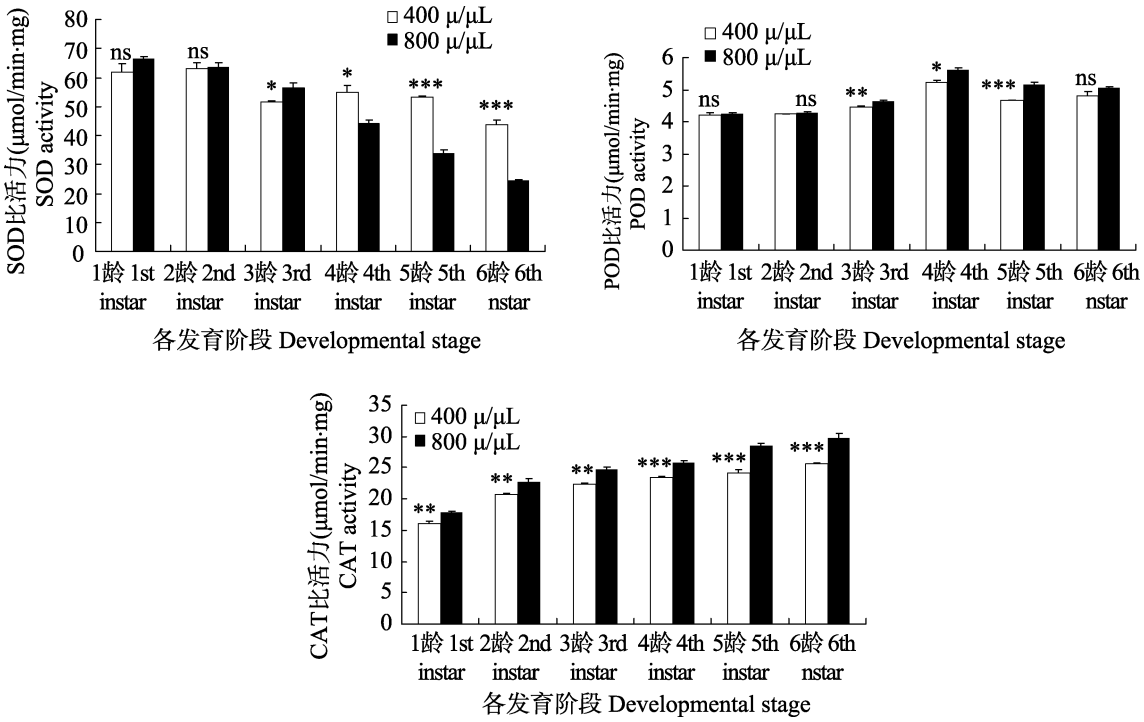


图 2　大气 CO_2 浓度升高对粘虫不同幼虫龄期体内保护酶活性的影响

Fig. 2　Influence of elevated CO_2 concentration on protective enzyme activities in different instar larvae of *Mythimna separata*

表 2　保护酶活性独立样本 *t*-检验分析结果

Table 2　The result of protective enzyme analysed by independent sample *t*-test

保护酶 Protective enzyme	1 龄幼虫 1st instar larva			2 龄幼虫 2nd instar larva			3 龄幼虫 3rd instar larva		
	t	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*
超氧化物歧化酶 SOD	1.418	16	0.229	0.075	16	0.944	3.319	16	0.029*
过氧化物酶 POD	0.449	13.245	0.670	0.799	16	0.448	3.446	16	0.009**
过氧化氢酶 CAT	4.466	16	0.002**	4.305	16	0.003**	21.730	16	0.003**
	4 龄幼虫 4th instar larva			5 龄幼虫 5th instar larva			6 龄幼虫 6th instar larva		
	t	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*
超氧化物歧化酶 SOD	3.979	16	0.016*	16.732	16	<0.001***	0.065	16	<0.001***
过氧化物酶 POD	3.352	16	0.010*	6.749	16	<0.001***	1.462	16	0.182
过氧化氢酶 CAT	16.026	16	<0.001***	14.119	16	<0.001***	15.414	16	<0.001***

对照相比均无显著性差异（$P>0.05$），3 至 5 龄幼虫的 POD 活性与对照相比呈显著差异（$P<0.05$），分别比对照升高了 1.05%、1.07%、1.10%，6 龄幼虫与对照相比无显著差异。

粘虫幼虫体内过氧化氢酶（CAT）活力在不同 CO_2 浓度下均呈现上升的趋势（图 2），且 800 μL/L CO_2 浓度下的粘虫 CAT 活力均高于 400 μL/L CO_2 浓度下的粘虫 CAT 活力，各龄期幼虫体内 CAT 活力均显著高于对照，其中 3 龄幼虫后达到极显著性差异（$P<0.001$）。

2.3 CO_2 浓度升高对粘虫体内蛋白酶活性的影响

在高 CO_2 浓度条件下，粘虫各龄期幼虫体内的总蛋白酶活力均高于对照，其中 2 龄和 6 龄幼虫均达到显著性差异（$P<0.05$），4 龄幼虫与对照相比上升了 1.23%，呈极显著差异（$P<0.001$）。400 μL/L CO_2 浓度条件下饲养的粘虫幼虫强碱性类胰凝乳蛋白酶比活力呈现随龄期增加逐渐下降趋势，而 800 μL/L CO_2 浓度条件下饲养的粘虫上述蛋白酶活性呈现先上升后下降的趋势，400 μL/L CO_2 浓度条件下饲养的粘虫幼虫强碱性类胰凝乳蛋白酶活性均高于 800 μL/L CO_2 浓度下的对应幼虫酶活性，其中 400 μL/L CO_2 浓度下的 1 龄至 3 龄粘虫幼虫强碱性类胰凝乳蛋白酶活性为 0.16、0.15 和 0.15 μmol/min·mg，分别比 800 L/L CO_2 浓度条件下饲养的粘虫对应幼虫酶活性上升了 0.33%、0.36%和 0.70%，均达到极显著差异水平（$P<0.05$），而 4 龄至 6 龄幼虫的上述酶活性与对照相比差异不显著（$P>0.05$）。400 μL/L CO_2 浓度条件下饲养的粘虫幼虫弱碱性类胰蛋白酶比活力均高于 800 μL/L CO_2 浓度下的幼虫，其中 1 龄至 6 龄幼虫的差异达到显著性水平（$P<0.05$），除 6 龄幼虫外其余龄期均达到极显著差异（$P<0.001$）。类胰凝乳蛋白酶比活力的变化趋势与弱碱性类胰蛋白酶比活力相似，各龄幼虫的比活力均显著低于对照。在高 CO_2 浓度条件下的粘虫幼虫蛋白酶活性总体呈下降趋势，龄期越大其体内的蛋白酶降低程度越明显，可能是因为 CO_2 浓度的升高导致粘虫移动速度变缓，能量消耗速度下降，取食量降低，共同促使蛋白酶活性的下降。

表 3 大气 CO_2 浓度升高对粘虫不同龄期幼虫体内蛋白酶活性的影响

Table 3 Influence of elevated CO_2 concentration on protease enzyme activities in different instar larvae of *Mythimna separata*

蛋白酶 Protease enzymes	不同 CO_2 浓度（μL/L）	1 龄幼虫 1st instar larva	2 龄幼虫 2nd instar larva	3 龄幼虫 3rd instar larva	4 龄幼虫 4th instar larva	5 龄幼虫 5th instar larva	6 龄幼虫 6th instar larva
总蛋白酶 Total protease (μmol/min·mg)	400	0.78±0.04	0.81±0.03	0.84±0.02	1.07±0.02	0.86±0.04	0.78±0.02
	800	0.82±0.03	0.91±0.03	1.02±0.05	1.31±0.03	1.04±0.06	0.85±0.01
	比值 Ratio	1.05	1.13	1.22	1.23	1.21	1.09
强碱性类胰蛋白酶 Active alkaline trypsin-like enzyme (μmol/min·mg)	400	0.16±0.006	0.15±0.008	0.15±0.005	0.13±0.004	0.11±0.003	0.09±0.004
	800	0.05±0.007	0.06±0.002	0.10±0.005	0.11±0.009	0.10±0.008	0.07±0.004
	比值 Ratio	0.33	0.36	0.70	0.85	0.86	0.73
弱碱性类胰蛋白酶 Weak alkaline trypsin-like enzume (μmol/min·mg)	400	1.82±0.03	1.82±0.03	1.85±0.03	1.84±0.035	1.77±0.06	1.72±0.05
	800	1.08±0.04	1.25±0.05	1.34±0.035	1.60±0.029	1.53±0.038	1.58±0.014
	比值 Ratio	0.59	0.68	0.83	0.87	0.87	0.92
类胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin-like enzyme (μmol/min·mg)	400	1.09±0.008	1.15±0.004	1.20±0.012	1.33±0.007	1.44±0.009	1.49±0.008
	800	0.60±0.006	0.65±0.023	0.82±0.007	0.82±0.009	0.83±0.009	0.93±0.015
	比值 Ratio	0.55	0.57	0.68	0.62	0.58	0.62

表 4　蛋白酶活性独立样本 *t*-检验分析结果

Table 4　The result of protease enzyme analysed by independent sample *t*-test

蛋白酶 Protease enzymes	1 龄幼虫 1st instar larva			2 龄幼虫 2nd instar larva			3 龄幼虫 3rd instar larva		
	t	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*
总蛋白酶 Total protease	0.683	16	0.514	2.554	16	0.034*	3.110	16	0.014*
强碱性类胰蛋白酶 Active alkaline trypsin-like enzyme	12.280	16	＜0.001***	7.468	16	0.001**	2.791	16	0.041*
弱碱性类胰蛋白酶 Weak alkaline trypsin-like enzume	16.125	16	＜0.001***	10.431	16	＜0.001***	11.124	16	＜0.001***
类胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin-like enzyme	8.327	16	＜0.001***	6.510	16	＜0.001***	3.608	16	0.016*
	4 龄幼虫 4th instar larva			5 龄幼虫 5th instar larva			6 龄幼虫 6th instar larva		
	t	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*	*t*	*df*	*P*
总蛋白酶 Total protease	7.851	16	＜0.001***	2.374	16	0.045*	2.688	16	0.028*
强碱性类胰蛋白酶 Active alkaline trypsin-like enzyme	1.059	16	0.320	0.969	16	0.361	1.804	16	0.109
弱碱性类胰蛋白酶 Weak alkaline trypsin-like enzume	5.167	16	0.001**	3.482	16	0.008**	2.809	16	0.041*
类胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin-like enzyme	7.734	16	＜0.001***	9.514	16	＜0.001***	7.642	16	＜0.001***

3　讨论

气候变暖是近几年全球气候变化最显著的特征，大气 CO_2 浓度升高强烈地影响着地球上的农林生态系统，并且可以通过间接的方式影响到植食性昆虫（戈峰，2008）。不同种类的昆虫对高 CO_2 浓度的响应也不同，CO_2 浓度升高增加了蚜虫对氨基酸的利用与补偿，降低了 3 种麦蚜的种间竞争力（戈峰等，2010a，2010b）。大气 CO_2 浓度升高不仅对昆虫的生长发育和繁殖力有影响，更作用于昆虫内部的正常生理代谢。超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶是生物体内普遍存在的防御氧化损伤的重要保护酶，这几种保护酶处于一种动态平衡的状态，使自由基维持在一个低水平，起到保护生物机体的作用（李周直等，1994）。戈峰等（2010a，2010b）认为在高 CO_2 浓度下，棉铃虫的 SOD、AchE 酶活性显著增加。郭同斌等（2006）研究表明，杨小舟蛾幼虫取食不同的杨树叶片后，其中肠 SOD 活力显著上升，而 CAT、POD 活力受到了显著抑制，本实验结果表明，粘虫幼虫体内的 SOD 活性呈现随龄期增加而逐渐下降的趋势，且 4 龄幼虫后下降趋势较为明显，达到显著性差异；POD、CAT 活力呈逐渐上升趋势，在高 CO_2 浓度下粘虫幼虫不同龄期的 CAT 活力均显著高于对照，这与郭同斌等（2006）的结果基本一致。粘虫在高 CO_2 浓度下，随着龄期的增加，其对高 CO_2 浓度作出类似于抗性的反应，POD、CAT 显著上升，机体内产生了大量的 H_2O_2，而此时 SOD 受到抑制，造成体内清除自由基遇到障碍。因此，CO_2 浓度的上升扰乱了粘虫幼虫体内 SOD、POD 和 CAT 3 种保护酶的动态平衡，对虫体产生伤害作用。

环境胁迫会引起昆虫体内一系列的生理变化，并伴随着昆虫体内内源毒素的产生。羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶、微粒体多功能氧化酶和谷胱甘肽-*S*-转移酶是昆虫体内重要的解毒酶系，对

粘虫分解外源毒物、维持正常生理代谢起重要作用。刘建业等（2014）比较了 CO_2 浓度升高对西花蓟马成虫体内解毒酶活性的变化，发现西花蓟马成虫体内 CarE，AchE 和 MFO 酶活性随着 CO_2 浓度的升高而显著上升。解娜等（2012 年）研究了粘虫高龄幼虫在室内取食低剂量 CryAc 杀虫蛋白，随着取食时间的延长，酯酶、谷胱甘肽-*S*-转移酶活力较对照显著降低。本研究结果表明，粘虫幼虫体内 4 种解毒酶的活力均随着 CO_2 浓度升高而显著上升，龄期越高上升幅度越显著，这与王学霞等（2011）关于 CO_2 浓度增加导致 B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* （Gennadius）体内 CarE 活性增强的结果一致，推测是由于 CarE 在内源或外源毒素代谢中能够催化酯类化合物水解，因此昆虫在逆境胁迫下通过提高自身 CarE 活力来适应环境的变化（Terriere and Yu，1974）。AchE 是生物神经传导中的一种关键性酶，其酶活力增强是昆虫对有毒物质胁迫的应激反应（李灿等，2007）。曾芸芸等（2012）报道了高 CO_2 浓度可显著增加棉铃虫乙酰胆碱活力，本研究表明，粘虫不同龄期幼虫体内 AchE 和 MFO 变化趋势基本一致，两种酶在 CO_2 浓度 800 μL/L 条件下的比活力均高于对照，且随着幼虫龄期的增加而增加，推测可能是由于不同龄期粘虫的体内神经递质乙酰胆碱的积累程度存在差异，而且需要通过提高体内 MFO 活力来适应高 CO_2 浓度的环境，从而维持正常的生理活动。徐艳聆等（2006）研究了随着亚洲玉米螟 *Ostrrinia furnacalis* 取食杀虫蛋白时间的延长，幼虫体内谷胱甘肽转移酶活性明显受到抑制，这与本研究的结果不一致。本研究表明，粘虫幼虫谷胱甘肽-*S*-转移酶的活性随着龄期的增加而下降，这可能是由于随着粘虫龄期的增加，其对高 CO_2 浓度的环境越适应。

中肠作为 Bt 的作用部位一直都备受国内外学者的关注，认为中肠蛋白酶的变化是产生抗性的主要机制之一（Candas *et al.*，2003）。本研究结果表明，粘虫总蛋白酶的比活力随着龄期的增加呈现先上升后下降的趋势，其中高 CO_2 浓度下的粘虫总蛋白酶比活力高于对照。在高 CO_2 浓度下强碱性类胰蛋白、弱碱性类胰蛋白以及类胰凝乳蛋白 3 种蛋白酶的比活力均低于对照，其中粘虫幼虫类胰凝乳蛋白活力显著低于 400 μL/L 条件下的对应幼虫类胰凝乳蛋白活力。推测可能是由于 CO_2 浓度升高，粘虫幼虫产生拒食作用，引起粘虫中肠 pH 值变化而影响蛋白酶活性。

综上所述，在高 CO_2 浓度条件下，粘虫幼虫体内的大多数酶系活力呈现下降趋势，大部分解毒酶和蛋白酶活性受到抑制，SOD、CAT 和 POD 3 种保护酶的动态平衡受到干扰而影响其正常的生理代谢，机体受损伤并随龄期的增加而加重，但随着龄期的增大，粘虫对 CO_2 的抗性也逐渐增强。由于影响粘虫酶活性的因素众多，而粘虫酶活性的神经调节机制也十分复杂，在未来的研究中可参考我国学者戈峰和陈法军（2006）有关大气 CO_2 浓度升高对昆虫的影响中提到的长期效应、寄主选择行为、种间关系等研究，从不同方面来具体诠释粘虫成虫体内相关酶活性及其生长发育、繁殖力的影响等研究。

参考文献 (References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for quantiation of microgram quantities of protein utilizing the priciple of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.

Candas M, Loseva O, Oppert B, Kosaraju P, Bulla LA, 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmaeal moth larval gut proteome. *Mol. Cell. Proteomics*, 2(1): 19–28.

Gao XW, 1987. The introduction of improved method for determination of cholinesterase activity by Corun. *Entomological Knowledge*, 24(4): 245–246. [高希武, 1987. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍. 昆虫知识, 24(4): 245–246.]

Ge F, 2008. Insect Ecology Theory and Method. Peking: Higher Education Press. 33–37. [戈峰主编, 2008. 昆虫生态学理论与方法. 北京：高等教育出版社. 33–37.]

Ge F, Chen FJ, 2006. Impacts of elevated CO_2 on insects. *Acta Ecologica Sinica*, 26(3): 935–944. [戈峰, 陈法军, 2006. 大气 CO_2 浓度增加对昆虫的影响. 生态学报, 26(3): 935–944.]

Ge F, Chen FJ, Wu G, Sun YC, 2010a. Insect Response to Elevated Atmospheric CO_2 Concentration. Peking: Science Press. 1–212. [戈峰, 陈法军, 吴刚, 孙玉诚, 2010a. 昆虫对大气 CO_2 浓度升高的响应. 北京：科学出版社. 1–212.]

Ge F, Chen FJ, Wu G, Sun YC, 2010b. Research advance on the response of insects to elevated CO_2 in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(2): 229–235. [戈峰, 陈法军, 吴刚, 孙玉诚, 2010b. 我国主要类型昆虫对 CO_2 升高响应的影响研究进展. 昆虫知识, 47(2): 229–235.]

Guo TB, Ji BZ, Jiang JH, Du W, Zhu GQ, Huang MR, 2006. Effect

of transgenic poplars on the activities of three protective enzymes in *Micromelalopha troglodyte* (Graeser) (Lepidoptera: Notodontidae). *Acta Entomologica Sinica*, 49(3): 381–386. [郭同斌, 嵇保中, 蒋继宏, 杜伟, 诸葛强, 黄敏仁, 2006. 转基因杨树对杨小舟蛾体内三种保护酶活力的影响. 昆虫学报, 49(3): 381–386.]

Heckel DG, 1994. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin insects. *Biocontrol Sci. Technol*., 4(4): 405–417.

Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007. Climate Change 2007; the physical science basis. Summary for policy markers. Report of working Group 1 of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

Jiang SJ, Luo LZ, Hu Y, Zhang L, 2010. Effect of Cry1Ac protein on grpwth and development, reproduction and flight protential of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(12): 1360–1366. [蒋善军, 罗礼智, 胡毅, 张蕾, 2010. Cry1Ac 毒蛋白对粘虫生长发育、繁殖及飞行能力的影响. 昆虫学报, 53(12): 1360–1366.]

Li C, Li ZZ, Zhou B, Zheng XW, Cao Y, 2007. Effect of carbon dioxide enriched atmosphere on the activity ofacetylcholinesterase in adults of *Stegobium paniceum and Lasioderma serricorne*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 34(6): 642–646. [李灿, 李子忠, 周波, 郑兴旺, 曹宇, 2007. 高浓度二氧化碳对药材甲和烟草甲乙酰胆碱酯酶活性的影响. 植物保护学报, 34(6): 642–646.]

Lindroth RL, 2010. Impacts of elevated atmosphereic CO_2 and O_3 on forests: phytochemistry, trophic interactions, and ecosystems dynamics. *Journal of Chemical Ecology*, 36(1): 2–21.

Liu JY, Qian L, Jiang XC, He SQ, Li ZY, Gui FR, 2014. Effect of elevated CO_2 concentration on the activities of detoxifying enzymes and protective enzymes in adults of *Fankliniella occidentails* and *F. intonsa* (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(7): 754–761. [刘建业, 钱蕾, 蒋兴川, 和淑琪, 李正跃, 桂富荣, 2014. CO_2 浓度升高对西花蓟马和花蓟马成虫体内解毒酶和保护酶的影响. 昆虫学报, 57(7): 754–761.]

Liu YK, Wang WX, Fu Q, Lai FX, Luo J, 2011. Effect of host plants on activities of detoxification and protective enzymes in three rice planthoppers. *Chiese Journal of Rice Science*, 25(6): 659–666. [刘玉坤, 王渭霞, 傅强, 赖凤香, 罗举, 2011. 寄主植物对 3 种稻飞虱解毒酶和保护酶活性的影响. 中国水稻科学, 25(6): 659–666.]

Li ZZ, Shen HJ, Jiang QG, Ji BZ, 1994. A study on the activities of endogenous enzymes of protective system in some insects. *Acta Entomologica Sinica*, 337(4): 339–403. [李周直, 沈惠娟, 蒋巧根, 嵇保中, 1994. 几种昆虫保护酶系统活力的研究. 昆虫学报, 37(4): 399–403.]

Piskorski R, Dorn S, 2011. How the oligophage codling moth *Cydia pomonella* survives on walnut despite its secondary metabolite juglone. *Journal of Insect Physiology*, 57(6): 744–750.

Shi L, Li HB, Kim HJ, Wang JJ, Du YZ, 2013. Effect of low temperature stress on antioxidase activity of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(4): 1062–1067. [史亮, 李鸿波, 金学柱,王建军, 杜予州, 2013. 低温胁迫对西花蓟马抗氧化酶活性的影响. 应用昆虫学报, 50(4): 1062–1067.]

Terriere LC, Yu SJ, 1974. Enzyme induction of detoxifying enzymes in insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(3): 366–373.

Tiwari S, Pelz-Stelinski K, Stelinski LL, 2011. Effect of Candidatus *Liberibacter asiaticus* infection on susceptibility of Asian citrus psyllid, *Diaphori nacitri*, to selected insecticides. *Pest Management Science*, 67(1): 94–99.

Van Asperen K, 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8(4): 401–406.

Wang CZ, Qin JD, 1996. Partial characterization of protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 39(1): 7–13. [王琛柱, 金俊德. 1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. 昆虫学报, 39(1): 7–13.]

Wang XX, Wang GH, Ge F, 2011. Effect of elevated CO_2 on the body size, enzyme actity and hostselection behavior of *Bemisia tabaci* biotype B. *Acta Ecological Sinica*, 31(3): 629–637. [王学霞, 王国红, 戈峰, 2011. 大气 CO_2 浓度升高对 B 型烟粉虱大小酶活及其寄主的选择性影响. 生态学报, 31(3): 629–637.]

Xie N, Jiang XF, luo LZ, Zhang L, 2012. Effect of Cry1Ac toxin on activities of some enzymes in thelarval midgut of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(2): 168–175 [解娜, 江幸福, 罗礼智, 张蕾, 2012. Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫中肠几种酶活性的影响. 昆虫学报, 55(2): 168–175.]

Xu YL, Wang ZY, He KL, Bai SX, 2006. Effect of transgenic Bt corn expressing Cry1AB toxin on activities of some enzymes in larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*(Guenee) (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 49(4): 562–567. [徐艳聆, 王振营, 何康来, 白树雄, 2006. 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. 昆虫学报, 49(7): 562–567.]

Zeng J, Jiang YY, Liu J, 2013. Analysis of the armyworm outbreak in 2012 and suggestions of monitoring and forecasting. *Plant Protection*, 39(2): 117–121. [曾娟, 姜云英, 刘杰, 2013. 2012 年黏虫暴发特点分析与监测预警建议. 植物保护, 39(2): 117–121.]

Zeng YY, Huang WK, Su L, Wu G, Zhuang J, Zhao WY, Hua HX, Li JS, Xiao NW, Xiong YF, 2012. Effect of elevated CO_2 on the nutrient composition andenzymes activities of *Nilaparavata lugens* nymphs fed on rice plants. *Science China Life Sciences*, 55(10): 920–926. [曾芸芸, 黄文坤, 苏丽, 吴刚, 庄静, 赵万云, 华红霞, 李俊生, 肖能文, 熊燕飞, 2012. 高 CO_2 浓度对水稻褐飞虱体内营养物质及酶活性的影响. 中国科学：生命科学, 42(9): 739–745.]

Zhang YH, Zhang Z, Jiang YY, Zeng J, Gao YB, Cheng DF, 2012. Preliminary analysis of the outbreak of the third-generation armyworm *Mythimna separata* in China in 2012. *Plant Protection*, 38(5): 1–8. [张云慧, 张智, 姜云英, 曾娟, 高月波, 程登发, 2012. 2012 年三代黏虫大发生原因初步分析. 植物保护, 38(5): 1–8.]