

大豆胰蛋白酶抑制剂和防御信号物质对斜纹夜蛾幼虫保护酶的影响*

吴国昭^{1,2,3} 尹能文^{1,2,3} 胡林^{1,2,3} 叶茂^{1,2,3} 宋圆圆^{1,2,3} 朱克岩⁴ 曾任森^{1,2,3**}

(¹亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广州 510642; ²农业部生态农业重点开放实验室, 广州 510642; ³华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广州 510642; ⁴德克萨斯农工大学昆虫学系, 美国德克萨斯)

摘要 以广食性害虫斜纹夜蛾为研究对象, 连续6代自二龄或三龄开始用含有大豆胰蛋白酶抑制剂 (soybean trypsin inhibitor, SBTI) 的人工饲料喂养幼虫, 饲养至五龄时测定 SBTI 对幼虫保护酶的影响。结果表明, SBTI 抑制斜纹夜蛾幼虫 SOD、CAT 活性, 随着饲养代数的增加, SBTI 的抑制效果降低; SBTI 可显著升高斜纹夜蛾幼虫 POD 活性。预先接触外源植物防御信号物质茉莉酸甲酯和水杨酸甲酯 48 h 均可显著影响斜纹夜蛾幼虫体内保护酶 SOD、POD、CAT 活性, 且可显著减缓 SBTI 对斜纹夜蛾幼虫 SOD、POD、CAT 活性的作用效果。表明, 斜纹夜蛾取食 SBTI 后能够调节自身的保护酶系统, 逐步适应蛋白酶抑制剂的毒害, 而预先接触植物防御信号物质可增强其对植物防御蛋白的适应能力。

关键词 蛋白酶抑制剂; 保护酶; 茉莉酸甲酯; 水杨酸甲酯

中图分类号 Q966 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)3-0652-07

Effects of soybean trypsin inhibitor and defense signaling compounds on the protective enzymes in *Spodoptera litura* larvae. WU Guo-zhao^{1,2,3}, YIN Neng-wen^{1,2,3}, HU Lin^{1,2,3}, YE Mao^{1,2,3}, SONG Yuan-yuan^{1,2,3}, ZHU-SALZMAN Ke-yan⁴, ZENG Ren-sen^{1,2,3**} (¹State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangzhou 510642, China; ²Key Laboratory of Ecological Agriculture, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510642, China; ³Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ⁴Department of Entomology, Texas A & M University, College Station, Texas, USA). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(3): 652-658.

Abstract: In this study, the second or third instars of euryphagous insect *Spodoptera litura* larvae were continuously fed with the diets containing soybean trypsin inhibitor (SBTI) for six generations, and the protective enzyme activities in the midgut and fatbody of the fifth instars of *S. litura* larvae were evaluated. SBTI inhibited the SOD and CAT activities, but the inhibition effect decreased with the increase of successive culture generation. On the other hand, SBTI promoted the POD activity significantly. Pre-exposure to methyl jasmonate and salicylate for 48 h had significant effects on the SOD, POD and CAT activities, and decreased the effects of SBTI on these protective enzymes activities significantly. These results suggested that *S. litura* could regulate its protective enzyme system and gradually adapt to protease inhibitors, while pre-exposure to volatile defense signaling compounds could enhance the adaptation of *S. litura* to plant defense proteins.

Key words: protease inhibitor; protective enzyme; methyl jasmonate; methyl salicylate.

植物在遭受到植食性昆虫攻击时, 会在形态、生理生化等方面产生防御反应, 诱导合成有毒的防御

物质, 从而影响植食性昆虫的生长、发育、繁殖与存活 (Arimura *et al.*, 2005; Mewis *et al.*, 2005; Lou & Baldwin, 2006)。植物的诱导防御物质包括次生代谢产物和防御蛋白质, 其中防御蛋白质包括蛋白酶抑制剂、多酚氧化酶、亮氨酸氨基肽酶、凝集素和几丁质酶等 (Chen, 2008), 而蛋白酶抑制剂是植物防

* 国家自然科学基金海外学者合作研究项目 (31028018) 和广东省自然科学基金项目 (S2011040004336) 资助。

** 通讯作者 E-mail: rszeng@scau.edu.cn

收稿日期: 2011-09-03 接受日期: 2011-11-29

御化合物中研究最多的。蛋白酶抑制剂的抗虫作用已被很多研究所证实(Macedo *et al.*, 2002; Sagili *et al.*, 2005; Oliveria *et al.*, 2007; Tamhane *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007)。已有结果表明,蛋白酶抑制剂能通过抑制昆虫幼虫中肠的蛋白酶活性而影响一些鳞翅目或鞘翅目幼虫的生长发育与存活(Tamhane *et al.*, 2005; Bhattacharyya *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007)。昆虫体内存在超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(oxidase, POD),它们能够清除细胞内的自由基,防止自由基累积产生的毒害,维持昆虫的正常生理活动(李周直等, 1994)。Fridovich(1977)将这3种酶称为保护酶系统。正常情况下,这3种酶可以维持昆虫体内自由基的代谢平衡,但是,当遭遇病原菌入侵或外源物质毒害后,其体内的自由基代谢可能发生异常,从而诱发脂质过氧化反应,并可能导致组织细胞发生氧应激性损伤(赵克然等, 2000; Djordjevic, 2004; Valavanidis, 2006)。李周直等(1994)研究表明,菜粉蝶、刺蛾体内SOD、CAT、POD与耐药性有关,陈尚文(2001)认为马尾松毛虫体内CAT和POD与耐药性存在一定的相关性,吴小锋等(1998)认为家蚕血液CAT与蚕体抗逆性有一定的相关性。

植物受到虫害袭击后通常启动茉莉酸和水杨酸防御信号途径,昆虫如何应对植物的防御信号目前很少研究(Li *et al.*, 2002),昆虫对于挥发性信号物质的响应更是缺乏研究。茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)和水杨酸甲酯(methyl salicylate, MeSA)均是植物挥发性防御反应信号物质,两者对昆虫保护酶系统的影响值得研究。本文通过连续用大豆胰蛋白酶抑制剂SBTI人工饲养不同虫龄斜纹夜蛾幼虫以及预先接触挥发性信号物质后,再用SBTI人工饲养对幼虫体内SOD、CAT和POD 3种保护酶活性的影响,探索斜纹夜蛾对大豆胰蛋白酶抑制剂和挥发性防御信号物质适应的生化机理。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫及饲养

1.1.1 供试虫源及饲养条件 斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)幼虫采自位于华南农业大学校园内实验农场,之后在实验室内用人工饲料进行饲养(李均, 2010),室内温度控制在 (25 ± 3) °C,相对湿度为50%~70%,光周期为14L:10D。

1.1.2 幼虫饲养方法 将室内刚孵化出的斜纹夜蛾幼虫置于内含人工饲料的塑胶盒(20 cm×12 cm×5 cm)中,用针于塑胶盒盖上打几个小孔保持盒内透气性。随后适时添加新鲜饲料,并及时清理塑胶盒中的粪便和更换塑胶盒,以保持幼虫生长环境的洁净。挑选大小一致的二龄或三龄幼虫用含有0.5%大豆胰蛋白酶抑制剂人工饲料进行饲养。

1.2 实验处理及取样

1.2.1 继代培养 实验设置3个处理:1)用普通人工饲料饲养幼虫(control);2)幼虫二龄期开始用含有0.5%(每100 g人工饲料50 °C时添加0.5 g大豆胰蛋白酶抑制剂)的大豆胰蛋白酶抑制剂人工饲料饲养;3)幼虫三龄期开始用含有0.5%的大豆胰蛋白酶抑制剂人工饲料饲养。每个处理3个重复,每个重复20头幼虫,饲养至五龄取中肠和脂肪体(每5头幼虫一组,-70 °C保存)。每个处理另留30头幼虫进行继代饲养,以第1代幼虫化蛹后羽化的成虫所产的卵作为第2代虫源进行继代培养,同样在二龄和三龄开始用大豆胰蛋白酶抑制剂饲养幼虫,第3代依此类推,每天更换饲料并连续饲养6代。

1.2.2 信号物质处理 挑选大小和体色一致的斜纹夜蛾二龄幼虫用挥发性信号物质MeJA和MeSA处理。挥发性物质的处理方法是將一小团灭菌脱脂棉塞进10 μL移液枪的枪头,再将枪头用透明胶固定在饲养斜纹夜蛾幼虫塑料杯的盖上。用2.5 μL移液枪准确量取1 μL的信号物质,点在移液枪枪头内的棉花上,迅速盖上塑料杯盖。挥发物处理48 h后进行更换饲料。实验设置以下6个处理:1)未接触信号物质,添加普通人工饲料喂养(control);2)接触MeJA 48 h后添加普通人工饲料喂养(MeJA);3)接触MeSA 48 h后添加普通人工饲料喂养(MeSA);4)未接触信号物质,添加含0.5% SBTI饲料喂养(SBTI);5)接触MeJA 48 h后添加含0.5% SBTI饲料喂养(MeJA+SBTI);6)接触MeSA 48 h后添加含0.5% SBTI饲料喂养(MeSA+SBTI)。每个处理3个重复,每个重复20头幼虫,饲养至五龄取中肠和脂肪体(每5头幼虫一组),-70 °C保存。

1.3 酶液制备

将五龄幼虫中肠和脂肪体样品加入预冷的 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.0的磷酸缓冲液(含1%聚乙烯吡咯烷酮)1 mL,在冰浴条件下匀浆,所得匀浆液于 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $0 \sim 4$ °C离心20 min,其上清液即为待

测的酶液。

1.4 酶活性测定

1.4.1 SOD 活性测定 参照王爱国等(1983)方法,利用氮蓝四唑法测定。3 mL 反应液(内含 0.3 mL 130 mol · L⁻¹的蛋氨酸,0.3 mL 0.75 mol · L⁻¹氮蓝四唑,0.3 mL 0.1 mol · L⁻¹的 EDTA-Na₂,0.3 mL 0.02 mol · L⁻¹的核黄素)加入 20 μL 酶液,置于 4000 lx 日光灯下反应 20 min,以遮光的对照管作为空白,于 560 nm 波长下比色,以未加酶液遮光处理的测定值作为还原率 100%,分别计算不同酶量反应体系抑制 NBT 光还原相对值。以抑制 NBT 光还原 50% 时的酶液用量为一个酶活单位(U),计算 SOD 活性以每毫克蛋白所含有的酶活单位(U · mg⁻¹ pro)表示。

1.4.2 POD 活性测定 采用 Simon 等(1974)愈创木酚比色法:3 mL 反应体系中含 0.2 mol · L⁻¹磷酸缓冲液(pH 6.0)2.9 mL,0.019 mL 愈创木酚,30% H₂O₂ 0.028 mL 和 50 μL 酶液,以缓冲液作参比,在 470 nm 波长下比色,每隔 1 min 测定 OD 值一次,连续测定 5 min,酶活性以 OD₄₇₀ · min⁻¹ · mg⁻¹ pro 为单位。

1.4.3 CAT 活性测定 采用可见光分光光度计法测定(程鲁京和孟泽,1994) CAT 活性。CAT 分解 H₂O₂ 的反应通过加入钼酸铵中止,剩余的 H₂O₂ 与

钼酸铵产生一种淡黄色的络合物,在 405 nm 处测定其生成量,即可计算出 CAT 的活性,CAT 活性单位定义为:每分钟分解 1 μmol 的 H₂O₂ 即为 1 个酶活性单位(U),CAT 活性以 U · mg⁻¹ pro 表示。

1.5 蛋白质含量的测定

蛋白质含量测定采用 Bradford(1976)方法,使用牛血清白蛋白作为标准蛋白。

1.6 数据分析

利用 EXCEL、SPSS 16.0 等软件进行数据统计处理,用 Tukey 新复极差法测验不同处理间的差异显著性(显著水平设为 0.05)。

2 结果与分析

2.1 大豆胰蛋白酶抑制剂对斜纹夜蛾幼虫保护酶的影响

2.2.1 SOD 活性 由表 1 可见,大豆胰蛋白酶抑制剂对五龄斜纹夜蛾幼虫中肠和脂肪体内 SOD 活性的抑制作用效果非常显著,第 1 代二龄幼虫用大豆胰蛋白酶抑制剂饲养,中肠和脂肪体 SOD 活性分别只有对照的 14% 和 16%。第 1 代三龄幼虫处理,中肠和脂肪体 SOD 活性分别是对照的 32% 和 33%。三龄幼虫用大豆胰蛋白酶抑制剂饲养,SOD 活性受影响小,其他各代也表现出相似的趋势。

随着继代饲养代数的增加,大豆胰蛋白酶抑制

表 1 斜纹夜蛾二龄或三龄幼虫开始持续用大豆胰蛋白酶抑制剂处理后 1~6 代五龄幼虫中肠和脂肪体内 SOD 活性
Table 1 SOD activity in the fifth instar larvae of *Spodoptera litura* continuously exposed to soybean trypsin inhibitor (SBTI) starting at second or third instar from the first to sixth generation

SBTI 处理世代数	SBTI 处理的龄期	中肠		脂肪体	
		SOD 活性 (U · mg ⁻¹ pro)	与对照比值	SOD 活性 (U · mg ⁻¹ pro)	与对照比值
1	Control	5.69±0.13 c	1	6.98±0.01 c	1
	2	0.80±0.00 a	0.14	1.12±0.05 a	0.16
	3	1.85±0.02 b	0.32	2.30±0.00 b	0.33
2	Control	5.40±0.25 c	1	7.31±0.23 c	1
	2	0.85±0.01 a	0.16	1.46±0.03 a	0.20
	3	1.53±0.01 b	0.28	2.05±0.03 b	0.28
3	Control	5.80±0.09 c	1	6.84±0.08 c	1
	2	0.99±0.01 a	0.17	1.85±0.05 a	0.27
	3	4.06±0.04 b	0.70	2.67±0.04 b	0.39
4	Control	5.80±0.09 b	1	7.36±0.16 c	1
	2	3.71±0.07 a	0.64	4.20±0.06 a	0.57
	3	5.45±0.24 b	0.98	4.86±0.08 b	0.66
5	Control	5.70±0.04 c	1	7.42±0.16 c	1
	2	4.3906±0.0261 a	0.77	5.19±0.12 a	0.70
	3	5.02±0.05 b	0.88	6.31±0.12 b	0.85
6	Control	5.95±0.06 b	1	6.70±0.06 a	1
	2	4.99±0.05 a	0.84	7.50±0.05 b	1.12
	3	11.42±0.11 c	1.92	9.78±0.14 c	1.46

同世代同列数据不同小写字母表示差异显著。下同。

剂对 SOD 活性抑制效果减弱,幼虫中肠和脂肪体内 SOD 活性升高幅度加快。饲养至第 6 代,二龄幼虫处理脂肪体内 SOD 活性与对照没有显著差异,三龄期处理的幼虫中肠和脂肪体内的 SOD 酶活性还显著高于对照,中肠和脂肪体内 SOD 活性分别比对照高出 92% 和 46%。

2.1.2 POD 活性 从表 2 可知,斜纹夜蛾幼虫取食含有 0.5% 的 SBTI 的饲料后,幼虫中肠和脂肪体内的 POD 活性显著高于对照,第 1 代二龄幼虫用大豆胰蛋白酶抑制剂饲养,中肠和脂肪体 POD 活性分别为对照的 10.46 倍和 4.92 倍。第 1 代三龄幼虫处理,中肠和脂肪体 POD 活性分别是对照的 8.68 倍和 4.10 倍。三龄幼虫用大豆胰蛋白酶抑制剂饲养,POD 活性升高幅度较小,其他各代也表现出相似的趋势;而且脂肪体内酶活性的升高幅度显著低于中肠,其他各代也呈现相似规律。

随着饲养代数的增加,继代幼虫中肠和脂肪体内的 POD 活性的升高幅度呈现先升后降的趋势。二、三龄期添加 SBTI 处理的继代幼虫中肠 POD 活性均在第 5 代达到最高值,分别为对照的 60.50、17.50 倍;而二、三龄期添加 SBTI 处理的继代幼虫脂肪体内 POD 活性则均在第 1 代就到最大值,分别为对照的 4.92、4.10 倍,且 SBTI 对二龄期添加 SBTI 处理的继代幼虫中肠和脂肪体内 POD 活性影响较

大,1~6 代幼虫 POD 活性均显著高于对照和三龄期添加 SBTI 处理的。饲养至第 6 代,二龄、三龄期处理的幼虫中肠和脂肪体内的 POD 酶活性还显著高于对照,分别为对照的 3.65、4.76 倍和 2.18、3.73 倍。由此可见,大豆胰蛋白酶抑制剂对低龄幼虫中肠和脂肪体内的 POD 活性作用效果更加显著。

2.1.3 CAT 活性 由表 3 可见,大豆胰蛋白酶抑制剂对 1~6 代继代饲养的斜纹夜蛾幼虫中肠和脂肪体 CAT 活性的作用效果显著,第 1 代二龄幼虫用大豆胰蛋白酶抑制剂饲养,中肠和脂肪体 CAT 活性分别是对照的 72% 和 166%,脂肪体内 CAT 活性升高且显著高于对照。第 1 代三龄幼虫用大豆胰蛋白酶抑制剂处理,中肠和脂肪体 CAT 活性受到抑制,分别是对照的 67% 和 91%。二龄幼虫用大豆胰蛋白酶抑制剂饲养,中肠 CAT 活性受影响小,其他各代也表现出相似的趋势。

随着饲养代数的增加,二、三龄期添加 SBTI 处理的继代幼虫中肠和脂肪体内的 CAT 活性呈现先升高再降低然后又升高的趋势,幼虫中肠 CAT 活性均在第 6 代达到最大值,分别为对照的 1.09、2.10 倍;大豆胰蛋白酶抑制剂对幼虫中肠 CAT 活性抑制效果减弱,幼虫中肠内 CAT 活性升高幅度加快。饲养至第 6 代,二龄幼虫处理脂肪体内 CAT 活性与对照没有显著差异,三龄期处理的幼虫中肠和脂

表 2 斜纹夜蛾二龄或三龄幼虫开始持续用大豆胰蛋白酶抑制剂处理后 1~6 代五龄幼虫中肠和脂肪体内 POD 活性
Table 2 POD activity in the fifth instar larvae of *Spodoptera litura* continuously exposed to soybean trypsin inhibitor (SBTI) starting at second or third instar from the first to sixth generation

SBTI 处理的世代	SBTI 处理的龄期	中肠		脂肪体	
		POD 活性	与对照比值	POD 活性	与对照比值
		($OD_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro}$)		($OD_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro}$)	
1	Control	0.0028±0.0001 a	1	0.0059±0.0001 a	1
	2	0.0293±0.0002 c	10.46	0.0290±0.0001 c	4.92
	3	0.0243±0.0002 b	8.68	0.0242±0.0003 b	4.10
2	Control	0.0030±0.0000 a	1	0.0058±0.0001 a	1
	2	0.1271±0.0030 c	42.37	0.0169±0.0002 c	2.91
	3	0.0512±0.0007 b	17.07	0.0098±0.0002 b	1.69
3	Control	0.0030±0.0001 a	1	0.0062±0.0003 a	1
	2	0.0970±0.0004 c	32.33	0.0257±0.0005 c	4.15
	3	0.0260±0.0003 b	8.67	0.0208±0.0003 b	3.36
4	Control	0.0031±0.0001 a	1	0.0058±0.0005 a	1
	2	0.1020±0.0008 c	34.00	0.0173±0.0008 c	2.99
	3	0.0130±0.0001 b	4.33	0.0091±0.0004 b	1.57
5	Control	0.0034±0.0005 a	1	0.0053±0.0001 a	1
	2	0.2057±0.0012 c	60.50	0.0249±0.0005 c	4.70
	3	0.0595±0.0002 b	17.50	0.0122±0.0003 b	2.30
6	Control	0.0027±0.0005 a	1	0.0059±0.0003 a	1
	2	0.0099±0.0001 c	3.65	0.0281±0.0012 c	4.76
	3	0.0059±0.0001 b	2.18	0.0220±0.0002 b	3.73

表3 斜纹夜蛾二龄或三龄幼虫开始持续用大豆胰蛋白酶抑制剂处理后1~6代五龄幼虫中肠和脂肪体内CAT活性
Table 3 CAT activity in the fifth instar larvae of *Spodoptera litura* continuously exposed to soybean trypsin inhibitor (SBTI) starting at second or third instar from the first to sixth generation

SBTI 处理的世代	SBTI 处理的龄期	中肠		脂肪体	
		CAT 活性 (U · mg ⁻¹ pro)	与对照比值	CAT 活性 (U · mg ⁻¹ pro)	与对照比值
1	Control	387.31±1.91 c	1	206.67±0.77 b	1
	2	279.19±0.65 b	0.72	342.77±0.59 c	1.66
	3	261.26±1.91 a	0.67	187.16±1.03 a	0.91
2	Control	378.05±1.03 c	1	189.16±1.28 b	1
	2	348.61±0.74 b	0.92	353.38±0.48 c	1.87
	3	333.86±0.25 a	0.88	128.91±0.34 a	0.68
3	Control	360.33±3.33 b	1	208.79±1.33 a	1
	2	167.59±0.31 a	0.47	576.27±0.33 c	2.76
	3	498.01±0.63 c	1.38	361.73±0.87 b	1.73
4	Control	388.98±3.27 c	1	216.95±1.00 b	1
	2	252.76±1.60 b	0.65	556.67±0.46 c	2.57
	3	218.20±0.55 a	0.56	165.70±0.74 a	0.76
5	Control	362.62±0.38 a	1	194.29±0.41 b	1
	2	367.24±0.26 a	1.01	187.38±0.56 a	0.96
	3	397.57±5.35 b	1.10	197.05±0.40 c	1.01
6	Control	343.29±0.19 a	1	196.25±2.77 b	1
	2	375.45±0.48 a	1.09	296.09±0.78 c	1.51
	3	720.66±0.82 b	2.10	121.98±0.33 a	0.62

脂肪体内的CAT活性还显著高于对照,中肠和脂肪体SOD活性分别比对照高出92%和46%。2、3龄期添加SBTI处理的继代幼虫脂肪体CAT活性则分别第4代、第3代达到最大值,其比值分别为对照的2.07、1.25倍。

2.2 防御信号物质和胰蛋白酶抑制剂对斜纹夜蛾幼虫保护酶的交互影响

2.2.1 SOD活性

与对照相比,斜纹夜蛾幼虫预先接触信号物质MeJA和MeSA 48 h可显著抑制其幼虫中肠和脂肪体内的SOD活性,SBTI也可显著抑制其幼虫中肠和脂肪体内的SOD活性,接触信号物质MeJA和MeSA 48 h可显著减缓SBTI对斜纹夜蛾幼虫中肠和脂肪体内的SOD活性的抑制效果,提高其幼虫体内的SOD活性。MeSA对斜纹夜蛾幼虫SOD活性的抑制效果显著强于MeJA处理,MeJA减缓SBTI对斜纹夜蛾幼虫中肠SOD活性的作用效果显著高于MeSA处理,而MeJA和MeSA对于幼虫脂肪体内的SOD活性的作用效果则差异不明显(表4)。

2.2.2 POD活性

由表5可知,与对照相比较,二龄斜纹夜蛾幼虫接触信号物质MeJA和MeSA 48 h及添加SBTI处理均可显著诱导斜纹夜蛾五龄幼虫中肠和脂肪体内POD活性升高,其POD活性的分别为对照的11.75、4.31倍。预先接触信号物质MeJA和MeSA 48 h显著减缓了SBTI对斜纹夜蛾幼

虫中肠和脂肪体POD活性升高的幅度,而且MeJA的减缓效果显著大于MeSA的作用效果。

2.2.3 CAT活性

斜纹夜蛾幼虫接触信号物质MeJA和MeSA 48 h后可显著增加其幼虫中肠内CAT活性,而抑制了其脂肪体内CAT活性,且MeSA的作用效果显著比MeJA的强。与对照相比,SBTI处理显著抑制了幼虫中肠内CAT活性,而预先接触信号物质MeJA和MeSA 48 h可显著减缓这种抑制作用,并且MeSA的减缓作用效果显著大于MeJA的作用效果。SBTI处理可显著升高幼虫脂肪体内CAT活性,而预先接触信号物质MeJA和MeSA 48 h明显延缓了CAT活性的升高幅度,且MeSA的延缓作用效果显著高于MeJA(表6)。

表4 MeJA/MeSA与胰蛋白酶抑制剂对斜纹夜蛾五龄幼虫中肠和脂肪体内SOD活性的影响

Table 4 Effects of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and MeJA/MeSA on SOD activity in the midguts and fatbodies of the fifth instar larvae of *Spodoptera litura*

处理	中肠		脂肪体	
	SOD 活性 (U · mg ⁻¹ pro)	与对照 比值	SOD 活性 (U · mg ⁻¹ pro)	与对照 比值
Control	5.69±0.13 f	1	6.98±0.01 d	1
MeJA	4.69±0.13 e	0.82	3.14±0.06 c	0.45
MeSA	2.29±0.07 b	0.40	2.69±0.03 b	0.39
MeJA+SBTI	3.15±0.08 d	0.55	3.07±0.09 c	0.44
MeSA+SBTI	2.82±0.05 c	0.50	2.63±0.03 b	0.38
SBTI	1.63±0.01 a	0.29	2.25±0.03 a	0.32

表5 MeJA/MeSA 和 大豆胰蛋白酶抑制剂对斜纹夜蛾五龄幼虫中肠和脂肪体内 POD 活性的影响

Table 5 Effects of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and MeJA/MeSA on POD activity in the midguts and fatbodies of the fifth instar larvae of *Spodoptera litura*

处理	中肠		脂肪体	
	POD 活性 ($OD_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$)	与对照 比值	POD 活性 ($OD_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$)	与对照 比值
Control	0.0028±0.0000 a	1	0.0059±0.0001 a	1
MeJA	0.0221±0.0007 d	7.89	0.0260±0.0003 c	4.41
MeSA	0.0241±0.0004 e	8.61	0.0258±0.0006 c	4.37
MeJA+SBTI	0.0051±0.0001 b	1.82	0.0082±0.0000 b	1.39
MeSA+SBTI	0.0068±0.0002 c	2.43	0.0086±0.0004 b	1.46
SBTI	0.0329±0.0002 f	11.75	0.0254±0.0003 c	4.31

表6 MeJA/MeSA 和 大豆胰蛋白酶抑制剂对斜纹夜蛾五龄幼虫中肠和脂肪体内 CAT 活性的影响

Table 6 Effects of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and MeJA/MeSA on CAT activity in the midguts and fatbodies of the fifth instar larvae of *Spodoptera litura*

处理	中肠		脂肪体	
	CAT 活性 ($U \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$)	与对照 比值	CAT 活性 ($U \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$)	与对照 比值
Control	386.47±1.49 d	1	196.54±0.87 c	1
MeJA	568.11±0.78 e	1.47	145.44±0.29 b	0.74
MeSA	1136.22±0.17 f	2.94	62.89±0.44 a	0.32
MeJA+SBTI	301.45±0.64 b	0.78	251.57±1.93 e	1.28
MeSA+SBTI	328.51±0.75 c	0.85	222.09±0.66 d	1.13
SBTI	212.56±0.52 a	0.55	255.51±1.00 e	1.30

3 讨论

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 SOD、CAT 和 POD 等各种保护酶系,其主要功能是清除昆虫体内的自由基,防御活性氧或其他过氧化物自由基对细胞膜系统的伤害(Allen *et al.*, 1984; Allen & Balin, 1989; Bolter & Chefurka, 1990),这些酶的活性与外界刺激物强度、昆虫耐药性、抗逆性有关(刘玉娣和赵士熙, 2002)。生物体在逆境条件下产生的活性氧,破坏了生物体内许多功能分子的作用。SOD 是生物体细胞内最重要的清除 O_2^- 自由基的酶,生成 H_2O_2 后, H_2O_2 与 O_2^- 形成毒性更强的 HO, 必须由 CAT 和 POD 来分解 H_2O_2 , 因此 CAT 和 POD 在生命系统的保护作用是必不可少的(吴小锋等, 1998; 陈尚文, 2001; 刘玉娣和赵士熙, 2002)。

MeJA 和 MeSA 是植物遭受昆虫或病原物攻击时植物产生的能够激活自身防御基因的信号物质, 这些信号物质可以诱导植物合成更多的抗虫物质和

防御蛋白, 保护植物免受侵害。但是, 也有研究表明, 昆虫可以“窃听”到植物产生的防御信号物质并作出相应的反防御反应, 如 P450 基因转录增强以提高昆虫对植物防御物质的适应能力, 提前做好准备抵抗植物的化学防御。Li 等(2002)用含有 JA 和 SA 的食物喂食五龄美洲棉铃虫幼虫, 发现这些信号物质可以显著诱导幼虫中肠和脂肪体内 P450 解毒酶基因, 从而产生过量的解毒酶提高昆虫对植物毒素的解毒能力。这表明多食性昆虫可以利用植物防御信号分子作为激活自身解毒系统的信号分子。

本研究表明, SBTI 对斜纹夜蛾幼虫中肠和脂肪体内的 SOD、POD、CAT 均有显著的作用(表 1—3), 随着继代饲养的代数的增加其作用效果减弱, 说明斜纹夜蛾适应 SBTI 的能力逐步增强。预先接触信号物质 MeJA 和 MeSA 可以延缓 SBTI 对幼虫中肠和脂肪体 SOD、POD、CAT 活性的作用效果, MeJA 的诱导效果显著高于 MeSA 的效果(表 4—6)。这说明斜纹夜蛾幼虫能够在接触到植物信号物质时可以调节自身的保护酶防御系统, 增强了斜纹夜蛾幼虫适应 SBTI 的能力。然而, SBTI 对斜纹夜蛾幼虫中肠和脂肪体内 SOD、POD、CAT 作用的时间效应以及浓度效应, MeJA 和 MeSA 与 SBTI 之间的作用机制如何还需进一步的研究。

参考文献

- 程鲁京, 孟泽. 1994. 钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶. 临床检验杂志, **12**(1): 6-8.
- 陈尚文. 2001. 马尾松毛虫过氧化氢酶及过氧化物酶与耐药性的关系. 昆虫学报, **44**(1): 9-14.
- 李均. 2010. 斜纹夜蛾 P450 基因的克隆、异源表达和对挥发性植物信号物质的响应(硕士学位论文). 广州: 华南农业大学.
- 李周直, 沈惠娟, 蒋巧根, 等. 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.
- 刘玉娣, 赵士熙. 2002. 小菜蛾过氧化氢酶和过氧化物酶与耐药性的关系. 福建农林大学学报, **31**(3): 304-307.
- 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 1983. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. 植物生理学报, **9**(1): 77-84.
- 吴小锋, 徐俊良, 崔为正. 1998. 家蚕血液过氧化氢酶活性及其与蚕体抗逆性的关系. 昆虫学报, **41**(2): 124-129.
- 赵克然, 杨毅军, 曹道俊. 2000. 氧自由基与临床. 北京: 中国医药科技出版社.
- Allen RG, Balin AK. 1989. Oxidative influence on development and differentiation: An overview of a free radical theory of development. *Free Radical Biology and Medicine*, **6**: 631-661.

- Allen RG, Farmer KJ, Newton RK, *et al.* 1984. Effects of paraquat administration on longevity, oxygen consumption, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides and glutathione in the adult housefly. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **78**: 31–33.
- Arimura G, Kost C, Boland W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1734**: 91–111.
- Bhattacharyya A, Leighton SM, Babu CR. 2007. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **145**: 669–677.
- Bolter CJ, Chefurka W. 1990. Extramitochondrial release of hydrogen peroxide from insect and mouse liver mitochondria causing the respiratory inhibitors phosphine, myxothiazol, and antimycin and spectral analysis of inhibited cytochromes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **278**: 65–72.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Chen MS. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, **15**: 101–114.
- Djordjevic VB. 2004. Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology*, **237**: 57–89.
- Fridovich I. 1977. Oxygen is toxic! *BioSciences*, **27**: 462–466.
- Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR. 2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature*, **419**: 712–719.
- Lou YG, Baldwin IT. 2006. Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuate* improves performance of native herbivores. *Plant Physiology*, **140**: 1126–1136.
- Macedo MLR, Mello GC, Freire MGM, *et al.* 2002. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 891–898.
- Mewis I, Appel HM, Hom A, *et al.* 2005. Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiology*, **138**: 1149–1162.
- Oliveria AS, Migliolo L, Aquino RO, *et al.* 2007. Purification and characterization of a trypsin papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its vitro effects towards digestive enzymes from insect pest. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 858–865.
- Sagili RR, Pankiw T, Salzman KZ. 2005. Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal gland protein content total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, **51**: 953–957.
- Simon L, Fatrai MZ, Jonas DE, *et al.* 1974. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochemical Physiology*, **166**: 387–392.
- Tamhane VA, Chougule NP, Giri AP. 2005. In vivo and in vitro effect of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1722**: 156–167.
- Tamhane VA, Giri AP, Sainani MN. 2007. Diverse forms of Pin-II family proteinase inhibitors from *Capsicum annum* adversely affect the growth and development of *Helicoverpa armigera*. *Gene*, **403**: 29–38.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, *et al.* 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **64**: 178–189.
- Wang ZY, Ding LW, Ge ZJ, *et al.* 2007. Purification and characterization of native and recombinant SaPIN2a, a plant sieve element-localized proteinase inhibitor. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 757–766.
- Zhu YC, Abel CA, Chen MS. 2007. Interaction of CryIAc toxin (*Bacillus thuringiensis*) and proteinase inhibitors on the growth, development, and midgut proteinase activities of the bollworm, *Helicoverpa zea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **87**: 39–46.

作者简介 吴国昭,女,1976年生,博士研究生,讲师,主要从事化学生态学研究。E-mail: yueyue970203@126.com

责任编辑 魏中青
