

# 诱杀植物香根草对稻蛀茎夜蛾幼虫解毒酶和乙酰胆碱酯酶的影响

鲁艳辉<sup>1</sup>, 梁 齐<sup>1</sup>, 郑许松<sup>1</sup>, 王国荣<sup>2</sup>, 吕仲贤<sup>1\*</sup>

(1. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 浙江省植物有害生物防控省部共建国家重点实验室培育基地, 杭州 310021; 2. 浙江省杭州市萧山区农业局, 杭州 211203)

**摘要** 香根草能够有效诱集水稻害虫稻蛀茎夜蛾 *Sesamia inferens* 雌成虫在其上产卵, 但孵化出的幼虫在香根草上不能完成生活史。为了初步明确香根草对稻蛀茎夜蛾幼虫生理生化水平的影响, 本研究分析测定了取食香根草后稻蛀茎夜蛾幼虫体内解毒酶和乙酰胆碱酯酶 AChE 活性的变化。结果表明: 与取食水稻的幼虫相比, 取食香根草后幼虫解毒酶谷胱甘肽硫转移酶 GSTs 和 AChE 活性显著提高。其他两种解毒酶, 羧酸酯酶 CarE 和细胞色素 P450 酶活性无显著差异。取食香根草后, 4 龄幼虫 GSTs 比活力约为取食水稻的 2.1 倍; 2 龄幼虫 AChE 比活力约为取食水稻的 2.9 倍。本研究结果表明香根草可能存在某些有毒活性物质或者次生代谢物质, 诱导了稻蛀茎夜蛾体内 GSTs 和 AChE 的活性, 这可能是稻蛀茎夜蛾取食香根草后的应急防御机制之一。此研究结果为深入阐明香根草在生理、生化水平上对稻蛀茎夜蛾幼虫的影响奠定了基础, 为开发以香根草为基础的稻蛀茎夜蛾绿色防控新技术提供了理论依据。

**关键词** 稻蛀茎夜蛾; 香根草; 解毒酶; 乙酰胆碱酯酶; 诱杀植物

**中图分类号:** S 433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.06.020

## Effects of the vetiver grass *Vetiveria zizanioides* on the activities of detoxification enzymes and acetylcholinesterase in the pink stem borer *Sesamia inferens* larvae

Lu Yanhui<sup>1</sup>, Liang Qi<sup>1</sup>, Zheng Xusong<sup>1</sup>, Wang Guorong<sup>2</sup>, Lü Zhongxian<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory and Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2. Xiaoshan Agricultural Bureau, Hangzhou, Zhejiang Province, Hangzhou 211203, China)

**Abstract** The vetiver grass *Vetiveria zizanioides* could effectively attract female adults of *Sesamia inferens* to lay eggs, while the offspring larvae could not complete their life cycles after feeding on vetiver. Aimed to preliminarily clear the physiological and biochemical effect of vetiver against the larvae of *S. inferens*, we determined the activities of the detoxification enzymes and acetylcholinesterase (AChE) of *S. inferens* larvae after feeding on vetiver and rice. The results showed that, compared with the larvae fed on rice, the activities of detoxification enzyme glutathione S-transferase (GSTs) and AChE were significantly increased in the larvae fed on vetiver. However, there was no significant difference in carboxylesterase (CarE) and cytochrome P450s activities. The GSTs activity in the fourth-instar larvae and the AChE activity in the second-instar larvae fed on vetiver were 2.1-, 2.9-fold higher than those in the larvae fed on rice. These results indicated that vetiver may have some active substances or secondary metabolite substances that induced GSTs and CarE activities in the larvae fed on vetiver, which may be one of the mechanisms for emergency adaptation of *S. inferens* against vetiver. This study lays the foundation for further elucidating the physiological and biochemical effect of vetiver against the larvae of *S. infer-*

收稿日期: 2017-02-24 修订日期: 2017-05-02

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0200800); 重点实验室培育基地(2010DS700124-ZZ1601); 公益性行业(农业)科研专项(201303017)

\* 通信作者 E-mail: luzxmh@163.com

ens, and provides a theoretical basis for the development of sustainable control technology for *S. inferens* based on the trap plant vetiver in rice ecosystem.

**Key words** *Sesamia inferens*; *Vetiveria zizanioides*; detoxification enzyme; acetylcholinesterase; trap plant

稻蛀茎夜蛾 *Sesamia inferens* (Walker), 旧称大螟, 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 是一种钻蛀性害虫, 寄主范围广, 能够取食水稻、茭白、高粱、玉米、甘蔗等数十种禾本科植物<sup>[1]</sup>。长久以来, 稻田稻蛀茎夜蛾的防治仍依靠化学农药。但是, 化学农药的不合理使用, 导致其抗药性不断提高, 加大了稻蛀茎夜蛾的猖獗危害。同时, 也带来了农药残留超标、环境污染等问题。目前, 水稻害虫的绿色防控技术已经成为当前的研究热点, 比如利用禾本科香根草 *Vetiveria zizanioides* (Linn.) Nash 防治水稻螟虫<sup>[2]</sup>。香根草对稻蛀茎夜蛾具有较强的引诱作用, 可引诱稻蛀茎夜蛾雌成虫在其上产卵, 但孵化出的幼虫取食香根草后生长发育缓慢进而不能完成生活史, 从而降低了稻蛀茎夜蛾种群数量, 减少了其对水稻的危害<sup>[3]</sup>。

在植物与植食性昆虫的协同进化过程中, 植物产生化学防御物质抵御害虫侵害, 害虫也诱导其体内相关酶系来克服植物中的潜在毒性<sup>[4]</sup>。植物次生代谢产物是影响昆虫与植物相互作用的重要因素, 表现为影响昆虫的取食行为及其对食物的利用<sup>[5]</sup>。许多植物次生物质对昆虫的解毒酶系具有诱导作用<sup>[6]</sup>。昆虫体内重要的解毒酶系有羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)、细胞色素 P450 和谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferase, GSTs)等<sup>[7]</sup>, 解毒酶系的改变是昆虫取食适应性的重要表现形式之一<sup>[8]</sup>。乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)是有机磷和氨基甲酸酯类药剂的作用靶标, 因此常被定义为靶标酶。目前, 已有许多关于取食不同寄主植物影响昆虫解毒酶和 AChE 活性变化的报道<sup>[5, 9-12]</sup>。但是取食香根草后对稻蛀茎夜蛾解毒酶系影响的研究尚未见报道, 本研究通过测定取食香根草后稻蛀茎夜蛾幼虫体内解毒酶和 AChE 活性的变化, 分析香根草对稻蛀茎夜蛾幼虫生长发育的影响, 以期为更好地建立以香根草为基础的稻蛀茎夜蛾绿色防控新技术奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植物

水稻品种‘浙优 12 号’购自浙江省农科种业有限公司。播种于温室塑料槽内, 约 30 d 后移栽至直

径为 12 cm 的塑料盆中, 至 45 d 分蘖期时剪取茎秆用于稻蛀茎夜蛾幼虫的饲喂试验。

香根草种苗购自深圳市鑫森森园林草坪有限公司。将香根草种苗种于温室, 以分蘖苗作为繁殖体, 待香根草分蘖较多时剪取茎秆用于稻蛀茎夜蛾幼虫的饲喂试验。

### 1.2 供试昆虫

稻蛀茎夜蛾种群于 2014 年 5 月采自杭州市萧山区义桥镇(30°04' N, 120°12' E)水稻田, 室内建立并维持种群, 幼虫采用人工饲料饲养, 饲料配方由中国水稻研究所提供<sup>[13]</sup>, 置于温度(27±2)℃, 相对湿度(70±5)%, 光周期 L//D=16 h//8 h 的智能人工气候室内饲养。待稻蛀茎夜蛾化蛹后将蛹收集起来, 放置在干净的养虫笼中, 保湿, 让其继续发育羽化, 对羽化后的成虫以 10% 的蜂蜜水提供营养。

选取初孵幼虫用于水稻(对照)和香根草的饲喂试验。当水稻饲喂的幼虫达 1、2、3、4 龄时, 对水稻和香根草饲喂的幼虫分别进行取样, 幼虫饥饿 3 h 后, 在液氮中速冻并立即转至-80℃冰箱中保存, 供后续酶活性测定试验用。试验中每处理各重复 3 次。

### 1.3 取食水稻和香根草后稻蛀茎夜蛾幼虫体内解毒酶活性测定

CarE 活性测定: 参照 Lu 等<sup>[7]</sup>的方法稍加改进。每个样品称取 100 mg, 加入 pH 7.0 的 PBS 1 mL, 充分匀浆后, 在 4℃, 12 000×g 条件下离心 15 min, 取上清液 40 μL 加入酶标板中, 每孔加入 100 μL 底物与显色剂的混合液(含 0.2 mol/L、pH6.0 的 PBS, 10 mmol/L α-乙酸萘酯和 1 mmol/L 固蓝 RR 盐, 混合后过滤)。然后加入 5 μL 酶液和 45 μL 0.1 mol/L、pH 7.6 的 PBS, 利用动力学方法测定 10 min 内 OD<sub>450</sub> 值变化, 以反应速度 mol/(min·mg) 表示酶活力。

GSTs 活性测定: 参照 Habig 等<sup>[14]</sup>的方法稍加改进。用 0.1 mol/L、pH 6.5 的 PBS 制备酶液, 在 96 孔酶标板中每孔依次加入 45 μL PBS、5 μL 酶液(制备方法同蛋白酶)、50 μL 1.2 mmol/L 的 1-氯-2, 4-二硝基苯(CDNB)和 50 μL 6 mmol/L 的还原型谷胱甘肽(GSH)。利用动力学方法测定 10 min 内 OD<sub>340</sub> 值变化, 以反应速度 nmol/(min·mg) 表示酶活力。

细胞色素 P450 酶活性测定:参考 Rose 等<sup>[15]</sup>的方法稍加改进。利用 0.1 mol/L、pH 7.6、含 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L 苯基硫, 1 mmol/L PMSF 的 PBS 制备酶液。在 96 孔酶标板中依次加入 2  $\mu$ mol/L 对硝基苯甲醚(溶解于 0.1 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液) 50  $\mu$ L, 9.6 mmol/L 的 NADPH 5  $\mu$ L 和 45  $\mu$ L 制备好的酶液。利用动力学方法测定 10 min 内 OD<sub>405</sub> 值变化, 以反应速度 nmol/(min · mg) 表示酶活力。

#### 1.4 取食水稻和香根草后稻蛙茎夜蛾幼虫体内 AChE 活性测定

AChE 活性测定:参照 Ellman<sup>[16]</sup>的方法并稍加改进。将稻蛙茎夜蛾幼虫利用 0.1 mol/L、pH 7.5 的 PBS 充分匀浆, 匀浆液于 4℃, 12 000 × g 条件下离心 15 min, 取 50  $\mu$ L 酶液加入酶标板中, 依次加入

100  $\mu$ L 碘化硫代乙酰胆碱 ATChI(0.5 mmol/L)、100  $\mu$ L DTNB 溶液(20 mmol/L)混合后, 利用酶标仪测 OD<sub>405</sub>。以反应速度 mol/(min · mg) 表示酶活力。

#### 1.5 蛋白含量测定

利用 Bradford<sup>[17]</sup>的考马斯亮蓝 G-250 法测定酶提取液中的蛋白含量, 用于酶活性计算。

#### 1.6 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据的统计分析, 并采用 T 测验进行数据的差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 稻蛙茎夜蛾幼虫取食香根草后体内解毒酶活性

稻蛙茎夜蛾在取食水稻和香根草后, 1~4 龄幼虫体内 CarE 比活力无显著差异(表 1)。

表 1 取食水稻和香根草后稻蛙茎夜蛾体内 CarE 比活力<sup>1)</sup>

Table 1 CarE specific activity of *Sesamia inferens* after feeding on rice and vetiver

植物 Plant	CarE 比活力/nmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> CarE specific activity			
	1 龄 1st instar	2 龄 2nd instar	3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar
水稻 Rice	(0.082 ± 0.023)a	(0.093 ± 0.022)a	(0.118 ± 0.017)a	(0.113 ± 0.011)a
香根草 Vetiver	(0.092 ± 0.009)a	(0.177 ± 0.021)a	(0.186 ± 0.011)a	(0.257 ± 0.047)a

1) 表中数据为平均值 ± 标准误, 同列数据后相同字母表示在 0.05 水平差异不显著。下同。

Data in the table are mean ± SE; The same letters in the same column indicate no significant difference at 0.05 level. The same below.

取食香根草后的 2~4 龄稻蛙茎夜蛾幼虫体内 GSTs 比活力显著高于取食水稻的, 且在 4 龄时两

者差异最显著, 取食香根草的幼虫 GSTs 比活力约为取食水稻的 2.1 倍(表 2)。

表 2 取食水稻和香根草后稻蛙茎夜蛾体内 GSTs 比活力

Table 2 GSTs specific activity of *Sesamia inferens* after feeding on rice and vetiver

植物 Plant	GSTs 比活力/nmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> GSTs specific activity			
	1 龄 1st instar	2 龄 2nd instar	3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar
水稻 Rice	(21.348 ± 9.367)a	(23.988 ± 11.336)b	(39.177 ± 7.081)b	(33.850 ± 9.294)b
香根草 Vetiver	(32.799 ± 15.480)a	(48.343 ± 23.327)a	(53.721 ± 23.193)a	(71.487 ± 27.352)a

稻蛙茎夜蛾在取食水稻和香根草后, 1~4 龄幼

虫体内细胞色素 P450 酶的比活力无显著差异(表 3)。

表 3 取食水稻和香根草后稻蛙茎夜蛾体内 P450 酶比活力

Table 3 Specific activity of P450 enzymes of *Sesamia inferens* after feeding on rice and vetiver

植物 Plant	P450 酶比活力/nmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> P450 enzyme specific activity			
	1 龄 1st instar	2 龄 2nd instar	3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar
水稻 Rice	(29.934 ± 11.564)a	(47.751 ± 6.605)a	(47.697 ± 1.800)a	(85.879 ± 17.399)a
香根草 Vetiver	(57.393 ± 3.153)a	(58.271 ± 1.157)a	(56.222 ± 5.785)a	(88.326 ± 5.736)a

### 2.2 稻蛙茎夜蛾幼虫取食香根草后体内 AChE 活性

取食香根草后的 2~4 龄稻蛙茎夜蛾幼虫体内 AChE 比活力显著高于取食水稻的, 且在 2 龄时两

者差异最显著, 取食香根草约为取食水稻上 AChE 比活力的 2.9 倍(表 4)。

表 4 取食水稻和香根草后稻蛀茎夜蛾体内 AChE 比活力

Table 4 AChE specific activity of *Sesamia inferens* after feeding on rice and vetiver

植物 Plant	AChE 比活力/nmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> AChE specific activity			
	1 龄 1st instar	2 龄 2nd instar	3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar
水稻 Rice	(14. 204±0. 943)b	(44. 767±6. 130)b	(65. 133±11. 708)b	(103. 235±8. 251)b
香根草 Vetiver	(21. 142±2. 237)a	(128. 958±7. 845)a	(119. 910±2. 777)a	(187. 488±34. 821)a

### 3 讨论

香根草作为诱杀植物防治水稻螟虫已成为稻螟绿色防控的重要措施之一,具有很大的开发潜力<sup>[2, 18-20]</sup>。笔者前期研究表明,二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫取食香根草后体内 CarE 和细胞色素 P450 酶的活性显著下降<sup>[12]</sup>。为了进一步明确香根草在生理、生化水平上对稻蛀茎夜蛾幼虫的影响,我们测定了取食香根草后稻蛀茎夜蛾幼虫体内 3 种重要解毒酶和 AChE 酶的活性变化。

昆虫取食寄主植物后,解毒酶系统会发生明显改变,包括酶的诱导作用等<sup>[5-6]</sup>。寄主植物中的毒素或次生物质在昆虫体内的降解主要依靠解毒酶,昆虫体内的解毒酶系主要是以 GSTs、CarE、细胞色素 P450 酶为主,这些酶系对维持昆虫体内正常的生理代谢功能和分解外源毒物都起着重要作用<sup>[21]</sup>。本文研究结果表明,取食香根草后稻蛀茎夜蛾幼虫 GSTs 活性显著升高,说明 GSTs 在稻蛀茎夜蛾对香根草的解毒代谢中发挥着重要作用。关于寄主植物诱导解毒酶活性的研究很多,吕朝军等<sup>[22]</sup>研究发现:取食苹果树的苹果黄蚜 *Aphis citricola* 的 CarE 活性显著高于取食梨树、李树和杏树的苹果黄蚜的 CarE 活性,推测这可能与寄主植物体内次生代谢物的种类不同相关。林佳和谢佳燕发现取食鹅观草的禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 与取食小麦和燕麦的禾谷缢管蚜酯酶活性存在显著差异<sup>[4]</sup>。安志兰等发现取食番茄、一品红、棉花和茄子的烟粉虱 *Bemisia tabaci* CarE、GSTs 等解毒酶均存在显著差异<sup>[11]</sup>。此外,李飞等研究发现:害虫能够通过改变自身的解毒酶或 AChE 的特性等方式不断适应寄主植物体内产生的次生代谢物<sup>[23]</sup>。稻蛀茎夜蛾取食香根草后,AChE 活性显著上升,可能是稻蛀茎夜蛾取食香根草后应急防御机制之一。也有研究表明,取食茄子的烟粉虱 AChE 活性分布与取食番茄的明显不同<sup>[11]</sup>;取食马铃薯、玉米、藜和大豆后对草地螟 *Loxostege sticticalis* 中肠 AChE 活性影响显著<sup>[24]</sup>;番茄、四季豆、苦瓜等寄主植物对南美斑潜蝇 *Liri-*

*myza huidobrensis* AChE 活性影响显著<sup>[10]</sup>。

解毒酶和 AChE 是昆虫体内重要的生化物质,取食不同寄主植物能够改变昆虫解毒酶或 AChE 活性。由于目前并无香根草内杀虫活性物质鉴定及香根草对稻蛀茎夜蛾幼虫致死作用机制的相关报道,我们推测可能是香根草内的次生物质或者有毒活性成分诱导或激活了稻蛀茎夜蛾体内与解毒代谢相关酶的表达,这也是昆虫对寄主植物的应急防御机制之一,但是这种现象是否能引起稻蛀茎夜蛾对香根草的完全适应,使其成为替代寄主,或者是否影响稻蛀茎夜蛾的耐药性仍有待进一步研究探讨。此研究结果为深入阐明香根草对稻蛀茎夜蛾幼虫生理生化水平的影响,为开发以香根草为基础的稻蛀茎夜蛾绿色防控新技术提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 赵钧,付文曦,韩召军. 大螟对 7 种杀虫剂的抗药性监测及相对敏感基线验证[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(1): 84-88.
- [2] Lu Zhongxian, Zhu Pingyang, Gurr G M, et al. Rice pest management by ecological engineering: a pioneering attempt in China [M]// Heong K L, Cheng Jiaan, Escalada M M. Rice planthoppers: ecology, management, socio-economics and policy. Springer, 2015: 161-178.
- [3] 梁齐, 鲁艳辉, 王国荣, 等. 寄主植物喷药对大螟产卵选择性的影响[J]. 植物保护学报, 2017, 44(1): 39-44.
- [4] 林佳, 谢佳燕. 不同植物对禾谷缢管蚜酯酶和乙酰胆碱酯酶活性的诱导作用[J]. 植物保护, 2014, 40(4): 115-117.
- [5] 高希武. 寄主植物对棉蚜羧酸酯酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 1992, 35(3): 267-272.
- [6] Riskallah M R, Dauterman W C, Hodgson E. Host plant induction of microsomal monooxygenase activity in relation to diazinon metabolism and toxicity in larvae of the tobacco budworm *Heliothis virescens* (F.) [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1986, 25(2): 233-247.
- [7] Lu Y H, Gao X W. Multiple mechanisms responsible for differential susceptibilities of *Sitobion avenae* (Fabricius) and *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) to pirimicarb [J]. Bulletin of Entomological Research, 2009, 99(6): 611-617.
- [8] Lindroth R L. Host plant alteration of detoxification activity in *Papilio glaucus* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1989, 50(11): 29-35.

