

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

徐艳聆^{1,2}, 王振营^{1*}, 何康来¹, 白树雄¹

(1. 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100094;

2. 沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110161)

摘要: 研究了表达 Cry1Ab 杀虫蛋白的转 Bt 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 幼虫解毒酶、保护酶和中肠蛋白酶活性的影响, 测定比较了取食转 Bt 基因玉米后幼虫体内 α -乙酸萘酯酶、乙酰胆碱酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、中肠总蛋白酶、类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的活力。结果表明, 取食转 Bt 基因玉米 48 h 后亚洲玉米螟幼虫体内的 α -乙酸萘酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶活力明显低于对照; 而乙酰胆碱酯酶活力显著高于对照, 在取食 48 h、60 h 和 72 h 的活力分别是对照的 2.00、1.50 和 2.50 倍。保护酶系、中肠总蛋白酶、弱碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的活性在取食 48 h 后明显受到抑制; 但强碱性类胰蛋白酶的活性显著高于对照, 取食 48 h、60 h 和 72 h 的活力分别是对照的 4.00、1.67 和 1.33 倍。乙酰胆碱酯酶和强碱性类胰蛋白酶可能与亚洲玉米螟对 Bt 的抗性有关。

关键词: 亚洲玉米螟; Cry1Ab 杀虫蛋白; 转 Bt 基因玉米; 解毒酶; 保护酶; 蛋白酶

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)04-0562-06

Effects of transgenic Bt corn expressing Cry1Ab toxin on activities of some enzymes in larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae)

XU Yan-Ling^{1,2}, WANG Zhen-Ying^{1*}, HE Kang-Lai¹, BAI Shu-Xiong¹ (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The activities of three detoxification enzymes (α -naphthyl acetate esterase, acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase), two protective enzymes (superoxide dismutase and catalase) and midgut proteases (total protease, trypsin-like enzyme and chymotrypsin-like enzyme) in 3rd instar larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* after feeding on Bt-transgenic corn were evaluated in the laboratory. The results showed that the activities of α -naphthylacetate esterase, glutathione-S-transferase in the larvae fed on Bt corn leaf for 48 h were greatly lower than that of the control fed on the non-transgenic corn. However, the acetylcholinesterase activity of the larvae fed on Bt corn for 48 h, 60 h and 72 h increased markedly, being 2.00-, 1.50- and 2.50-fold higher than that of the control, respectively. The activities of protective enzymes, total protease, weak trypsin-like enzyme and chymotrypsin-like enzyme in the larvae fed on Bt corn for 48 h were also significantly lower than that of the control. However, the activities of the active alkaline trypsin-like enzyme were obviously higher than those of the control. The active alkaline trypsin-like enzyme activities of the larvae fed on Bt corn for 48 h, 60 h and 72 h were 4.00-, 1.67- and 1.33-fold higher than that of the control. The results suggest that acetylcholinesterase and active alkaline trypsin-like enzyme may be associated with Asian corn borer resistance to Bt.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; Cry1Ab toxin; Bt-transgenic corn; detoxification enzyme; protective enzyme; protease

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目(2001CB109004); 国家自然科学基金项目(30370967)

作者简介: 徐艳聆, 女, 1978 年生, 博士研究生, 研究方向为转基因生物安全, E-mail: yanlingxu@eyou.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wangzy61@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2005-11-18; 接受日期 Accepted: 2006-03-10

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 是我国玉米生产上最重要的害虫,对玉米的产量和质量影响很大(周大荣和何康来,1995)。由于玉米螟寄主植物种类多,且化性不一,造成世代发生重叠,防治效果不理想,特别是穗期玉米植株高,密度大,防治难度很大。利用转基因技术培育抗虫作物为害虫防治提供了新途径,表达 Cry1Ab 杀虫蛋白的转 Bt 基因抗虫玉米对欧洲玉米螟 *O. nubilalis* (Hbn.) 具有很好的控制作用,已在多个国家商品化生产种植 (Shelton *et al.*, 2002);室内和田间结果表明对亚洲玉米螟也具有很好的控制作用(He *et al.*, 2003a, 2003b)。我国自己研发的转 Bt 基因玉米也已进入田间释放阶段,国外公司的转 Bt 基因抗虫玉米被批准在我国进行环境释放,有的还进入了生产性试验阶段。与 Bt 纯晶体蛋白不同,转 Bt 基因玉米导入的是经过人为修饰的 δ -内毒素基因活性片段部分,且带有增强的表达启动子,编码的活性杀虫蛋白无需活化即可与靶标害虫中肠上皮细胞的受体结合 (Perlak *et al.*, 1990),因此有必要深入研究转 Bt 基因玉米对靶标害虫的致病机理。

关于 Bt 杀虫蛋白对昆虫的作用机制大多数研究主要集中在昆虫组织病理学观察和杀虫蛋白与中肠上皮细胞膜之间的结合作用上,对昆虫的酶活性影响的研究报道则较少。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。解毒酶系主要是以 α -乙酸萘酯酶、乙酰胆碱酯酶和谷胱甘肽转移酶为代表的酯酶,对分解外源毒物、维持正常生理代谢起重要作用(陈长琨,1993);已经有报道证实昆虫的解毒酶系受 Bt 的影响而变化,可能直接参与了 Bt 杀虫蛋白的代谢作用并与抗性的产生有关(梁革梅等,2001)。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)是生物体内普遍存在的两种防御氧化损伤的重要保护酶,SOD 的作用是把 $O_2^{\cdot-}$ 歧化成 H_2O_2 , H_2O_2 能与 $O_2^{\cdot-}$ 形成毒性更强的氢氧自由基($HO\cdot$),但细胞内的 CAT 可以将 H_2O_2 转化成水,生物体内的几种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,起到保护生物机体的作用(李周直等,1994)。但当昆虫取食转 Bt 基因植物机体受到损伤后这种平衡可能受到破坏,从而过量的 $O_2^{\cdot-}$ 对生物产生损伤。中肠是昆虫消化吸收食料的重要场所,是 Bt 杀虫蛋白的作用部位,一直是 Bt 蛋白杀虫机理研究涉及的重要组织,昆虫中肠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,也是激活 Bt 原毒素的重要酶系,研究 Bt 杀虫蛋

白对中肠蛋白酶生物化学的影响对于 Bt 杀虫蛋白的作用方式和致病机理具有重要意义,而且国内外已有多项报道认为中肠的胰蛋白酶与抗性的产生密切相关,可能是抗性产生的主要机理。因此,研究转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟幼虫酶系的影响不但有利于揭示转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟作用的生理生化机制,还可为抗性产生机理提供理论依据,有利于实现转 Bt 基因玉米的持续利用。

1 材料与方法

1.1 供试玉米

试验用玉米为孟山都公司的转 *cry1Ab* 杀虫蛋白基因的 Bt 玉米 MON810(品种为 DK647BTY)及其非转基因对照品种(DK647),种植在中国农业科学院植物保护研究所农场,在玉米心叶期从田间采回心叶,在 0.3% 的 NaCl 中浸泡 3 min,用蒸馏水冲洗 3 遍,在滤纸上吸干水分,备用。

1.2 供试虫源

取来自河北省衡水市在室内用无琼脂半人工饲料(宋彦英等,1999)饲养了 36 代的亚洲玉米螟 3 龄幼虫,作为供试虫源。

1.3 供试药剂

碘化硫代乙酰胆碱、5,5-二巯基-双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、毒扁豆碱、胺苯磺胺偶氮酪蛋白、 α -N-苯甲酰-DL-精氨酸-P-硝基苯胺(BAPNA)、P-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)和 N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯(BTEE)购自 Sigma 公司。1,2-二氯-4-硝基苯(CDNB)购自 Fluka 公司。其他化学试剂均为国产分析纯。SOD、CAT 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4 解毒酶活力测定

1.4.1 酶的制备:将玉米螟 3 龄幼虫饥饿 2 h,接在玉米心叶(MON810 及其对照)上饲喂,在取食饲料 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 和 72 h 后,将 15 头幼虫放入预冷过的玻璃匀浆器中,加入 5 mL pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(含 0.1% Triton X-100),冰浴匀浆。匀浆液在 4℃ 下 $10\ 000 \times g$ 离心 10 min。取上清液作为酶源。每处理重复 3 次,在 8452A 型紫外分光光度计下分析酶活力。

1.4.2 α -乙酸萘酯酶活力测定:参照 van Asperen (1962)方法。反应混合液中含有 10 μ L 酶液,3.49 mL 0.04 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0),0.5 mL 4×10^{-4} mol/L 的 α -乙酸萘酯液,在 37℃ 水浴中保温 30

min 加入 0.5 mL 显色剂 0.1% 固牢蓝 B 盐与 SDS 溶液按 2:5 混合), 室温下放置 10 min, 600 nm 处比色。每处理重复测定 3 次, 以下均同。以 α -萘酚作标准曲线。

1.4.3 乙酰胆碱酯酶活力测定: 参照 Ellmar(1961) 方法。反应混合液含有 50 μ L 酶液, 2.8 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 8.0), 50 μ L 0.075 mol/L 的碘化乙酰胆碱, 0.1 mL 0.01 mol/L 的 DTNB 液, 在 25 $^{\circ}$ C 水浴中保温 15 min, 加入 0.1 mL 10^{-3} mol/L 毒扁豆碱。410 nm 处比色。用谷胱甘肽作标准曲线。

1.4.4 谷胱甘肽-S-转移酶活力测定: 参照 Booth (1961) 方法。反应混合液含 0.1 mL 酶液, 2.9 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 8.0), 0.7 mL 0.03 mol/L 的谷胱甘肽液, 50 μ L 0.1 mol/L 的 CDNB 液, 在 25 $^{\circ}$ C 水浴中反应 30 min, 加热使其失活, 在 350 nm 处比色。

1.5 保护酶系活力测定

1.5.1 SOD 活力测定主要原理: 通过黄嘌呤及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, 用可见光分光光度计测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时, 则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用, 使形成的亚硝酸盐减少, 比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值。以每毫克蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U)。

1.5.2 CAT 活力测定主要原理: 过氧化氢酶分解 H_2O_2 的反应可通过加入钼酸铵而迅速中止, 剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物, 在 405 nm 处测定其生成量, 以每毫克蛋白每秒分解 1 μ mol H_2O_2 的量为一个活力单位 (U), 可计算出 CAT 的活力。

1.5.3 具体操作步骤: 按 SOD 和 CAT 试剂盒说明进行。

1.6 亚洲玉米螟幼虫中肠主要蛋白酶活性的测定

参照王琛柱和钦俊德 (1996) 方法。

1.6.1 中肠酶液的制备: 玉米螟幼虫在 0~4 $^{\circ}$ C 下迅速解剖, 用预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液冲洗, 截取中肠及其内含物, 冰冻贮存 (-20 $^{\circ}$ C)。测试前, 取出稍融后, 以 0.15 mol/L 加适量 NaCl 溶液在冰浴中匀浆。15 000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清液作为酶液。每处理重复 3 次。

1.6.2 中肠总蛋白酶活性测定: 用氨基磺胺偶氮酪蛋白作为底物。偶氮酪蛋白以 20 mg/mL 的浓度

溶于 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液, 取 0.3 mL 该液加入 0.3 mL 含有中肠酶液的反应缓冲液 (0.2 mol/L, pH 10.50 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液) 中, 30 $^{\circ}$ C 反应 2 h, 加入 0.6 mL 的 20% (重量/体积) 三氯乙酸终止反应。反应混合物在 15 000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清液, 在 366 nm 测紫外吸光值。

1.6.3 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 μ L 加入 1.5 mL 含有中肠酶液的反应缓冲液 (0.1 mol/L, pH 10.50 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液) 中, 20 min 后, 加入 0.5 mL 30% (体积/体积) 乙酸终止反应, 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 8.50 的 Tris-HCl 缓冲液。

1.6.4 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% (体积/体积) 甲醇的 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液中, 取该液 0.5 mL 加入 0.5 mL 含中肠液的反应缓冲液 (0.2 mol/L, pH 8.50 的 Tris-HCl 缓冲液), 256 nm 处测定光吸收值。TAME、BAPNA、BTEE 的克分子消光值分别为 540、8 800、964, 用以计算相应水解底物的摩尔数。

1.7 可溶性蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法测定 (Bradford, 1976), 以牛血清蛋白 (BSA) 为标准蛋白。

1.8 实验数据分析

应用 SAS 软件对实验数据进行分析, 差异显著性比较采用 *t* 测验。

2 结果与分析

2.1 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟幼虫体内解毒酶活力的影响

从表 1 可以看出在取食转 Bt 基因玉米心叶最初 6 h, 玉米螟幼虫体内的 α -乙酸萘酯酶的活力略高于对照, 但差异不显著; 随着取食时间的延长, α -乙酸萘酯酶的活力逐渐被抑制, 48 h 后显著低于对照 ($P < 0.01$), 到 60 h 与对照的活力比值仅为 0.67。乙酰胆碱酯酶的活力从取食 24 h 开始高于对照, 到 72 h 活力达到对照的 2.5 倍。谷胱甘肽转移酶的活力在取食初期与对照相近, 60 h 后显著低于对照 ($P < 0.05$), 至 72 h 时达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

表 1 取食转 Bt 基因玉米不同时间后亚洲玉米螟幼虫体内解毒酶活力的变化

Table 1 Changes in the activities of three detoxification enzymes in *Ostrinia furnacalis* larvae fed on Bt-transgenic corn for different hours

取食时间 Feeding time (h)	α -乙酸萘酯酶 α -naphthylacetate esterase [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$]			乙酰胆碱酯酶 Acetylcholinesterase [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$]			谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione-S-transferase [OD/($\text{min}\cdot\text{mg}$)]		
	转 Bt 基因玉米	对照	比值	转 Bt 基因玉米	对照	比值	转 Bt 基因玉米	对照	比值
	Bt-transgenic corn	CK	Ratio	Bt-transgenic corn	CK	Ratio	Bt-transgenic corn	CK	Ratio
6	0.25 ± 0.02	0.20 ± 0.01	1.25	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	1.00	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.92
12	0.28 ± 0.01*	0.26 ± 0.01	1.08	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	1.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	1.00
24	0.15 ± 0.01*	0.22 ± 0.01	0.68	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.50	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.88
36	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.01	1.10	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.50	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.00	1.00
48	0.26 ± 0.02**	0.35 ± 0.01	0.74	0.04 ± 0.00**	0.02 ± 0.00	2.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	1.00
60	0.22 ± 0.01**	0.33 ± 0.02	0.67	0.03 ± 0.00**	0.02 ± 0.00	1.50	0.07 ± 0.00*	0.08 ± 0.00	0.88
72	0.23 ± 0.01**	0.30 ± 0.01	0.77	0.05 ± 0.00**	0.02 ± 0.00	2.50	0.06 ± 0.00**	0.08 ± 0.00	0.75

* 和 ** 分别表示与对照差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$); 下同。* and ** denote significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ compared with the control, respectively; the same below.

2.2 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟幼虫体内保护酶活力的影响

从表 2 可看出,亚洲玉米螟幼虫在取食转 Bt 基因玉米的前 48 h 超氧化物歧化酶(SOD)活力略高于对照,但 60 h 后则显著低于对照($P < 0.01$)。过氧化氢酶(CAT)的活性在取食转 Bt 基因玉米 48 h 达

到对照组的 1.5 倍,但没有达到显著性差异,72 h 后活力则显著低于对照($P < 0.01$)。在取食初期,转 Bt 基因玉米中的 Bt 杀虫蛋白对亚洲玉米螟幼虫体内保护酶系的影响并不十分显著,但随着取食时间的延长,虫体受损伤的加重,保护酶系的活力则明显低于对照。

表 2 取食转 Bt 基因玉米不同时间后亚洲玉米螟幼虫体内保护酶活力的变化

Table 2 Changes in the activities of two protective enzymes in *Ostrinia furnacalis* larvae fed on Bt-transgenic corn for different hours

取食时间 Feeding time (h)	超氧化物歧化酶(SOD) Superoxide dismutase (U/mg)			过氧化氢酶(CAT) Catalase (U/mg)		
	转 Bt 基因玉米	对照	比值	转 Bt 基因玉米	对照	比值
	Bt-transgenic corn	CK	Ratio	Bt-transgenic corn	CK	Ratio
6	43.31 ± 1.24	42.64 ± 1.02	1.02	0.68 ± 0.14	0.62 ± 0.07	1.10
12	40.54 ± 1.53	40.96 ± 1.43	0.99	0.57 ± 0.06	0.57 ± 0.08	1.00
24	50.43 ± 1.17**	45.26 ± 0.73	1.11	0.57 ± 0.06	0.65 ± 0.05	0.88
36	75.10 ± 13.25	55.14 ± 3.10	1.36	0.70 ± 0.06	0.64 ± 0.07	1.09
48	65.56 ± 5.37	64.72 ± 2.94	1.01	1.14 ± 0.20	0.75 ± 0.08	1.52
60	38.57 ± 1.63**	49.91 ± 2.93	0.77	1.28 ± 0.13	0.97 ± 0.12	1.32
72	61.73 ± 1.35**	81.42 ± 2.49	0.76	0.73 ± 0.16**	1.37 ± 0.14	0.53

2.3 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟幼虫中肠蛋白酶活力的影响

表 3 显示,亚洲玉米螟幼虫在取食 Bt 玉米心叶 24 ~ 48 h 时,其中肠总蛋白酶的活性明显高于对照,60 h 后随着幼虫的发病,中肠总蛋白酶活性呈明显下降趋势,显著低于对照;强碱性类胰蛋白酶的活性从取食后 12 h 就明显高于对照($P < 0.01$),取食 48 h 时达到对照的 4 倍,2 h 后随着幼虫趋近死亡活力才有所下降,但仍高于对照;弱碱性类胰蛋白酶的活力在取食初期与对照总体上无明显差异,但

36 h 后也明显受到抑制,至 72 h 活性约是对照的一半。类胰凝乳蛋白酶的活性变化与弱碱性类胰蛋白酶相似,在感染前期与对照无显著差异,48 h 后明显低于对照。亚洲玉米螟幼虫在取食转 Bt 基因玉米 48 h 后中肠蛋白酶活性总体呈显著下降趋势,中肠蛋白酶活性在染病后期明显降低,可能是因为 Bt 杀虫蛋白被消化后引起肠道 pH 发生变化而影响蛋白酶的活性,再加上拒食后饥饿的影响,共同促使蛋白酶活性下降。

表 3 取食转 Bt 基因玉米不同时间后亚洲玉米螟幼虫中肠蛋白酶活力的变化

Table 3 Changes in the midgut protease activities in *Ostrinia furnacalis* larvae fed on Bt-transgenic corn for different hours

取食时间 Feeding time (h)	总蛋白酶 Total protease [OD(min·mg)]			强碱性类胰蛋白酶 Active alkaline trypsin-like enzyme [μmol/(min·mg)]			弱碱性类胰蛋白酶 Weak alkaline trypsin-like enzyme [μmol/(min·mg)]			类胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin-like enzyme [μmol/(min·mg)]		
	转 Bt 基因玉米 Bt-transgenic corn	对照 CK	比值 Ratio	转 Bt 基因玉米 Bt-transgenic corn	对照 CK	比值 Ratio	转 Bt 基因玉米 Bt-transgenic corn	对照 CK	比值 Ratio	转 Bt 基因玉米 Bt-transgenic corn	对照 CK	比值 Ratio
	12	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	1.00	0.13 ± 0.01**	0.05 ± 0.00	2.60	2.87 ± 0.20	3.12 ± 0.15	0.92	0.60 ± 0.01	0.58 ± 0.01
24	0.04 ± 0.00**	0.02 ± 0.00	2.00	0.14 ± 0.00**	0.05 ± 0.00	2.80	1.98 ± 0.01**	2.09 ± 0.01	0.95	0.73 ± 0.01**	0.66 ± 0.01	1.11
36	0.04 ± 0.00**	0.02 ± 0.00	2.00	0.13 ± 0.00**	0.08 ± 0.00	1.63	1.24 ± 0.02**	1.82 ± 0.08	0.68	0.39 ± 0.01	0.39 ± 0.03	1.00
48	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	1.33	0.12 ± 0.00**	0.03 ± 0.00	4.00	2.01 ± 0.02**	2.13 ± 0.01	0.94	0.51 ± 0.01**	0.78 ± 0.02	0.65
60	0.02 ± 0.00**	0.04 ± 0.00	0.50	0.05 ± 0.00**	0.03 ± 0.00	1.67	0.76 ± 0.03**	1.23 ± 0.05	0.62	0.56 ± 0.00**	0.70 ± 0.01	0.80
72	0.01 ± 0.00*	0.02 ± 0.00	0.50	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	1.33	0.74 ± 0.01**	1.35 ± 0.03	0.55	0.51 ± 0.02	0.64 ± 0.00	0.80

3 讨论

本研究结果表明,在取食转 *cry1Ab* 杀虫蛋白基因的 Bt 玉米 48 h 后亚洲玉米螟幼虫体内的 α -乙酸萘酯酶和谷胱甘肽转移酶的活性均明显受到抑制,显著低于对照。随着饲喂转 Bt 基因玉米时间的延长导致酶活性降低,从而干扰了昆虫正常的生理代谢,这也可能是转 Bt 基因玉米杀虫重要机制之一,而乙酰胆碱酯酶的活力却显著高于对照,作为分解代谢酶可能直接参与了 Bt 的代谢作用,与害虫对 Bt 的抗性有关。

申继忠和钱传范(1994)报道大蜡螟 *Galleria mellonella* 幼虫取食苏云金杆菌后 SOD 的活性显著升高;Ding 等(2001)也报道转 Bt 基因白杨可使美国白蛾 *Hyphantria cunea* 体内的 SOD 和 CAT 活性显著升高,在达到峰值后迅速降低。本研究并未发现亚洲玉米螟在取食转 Bt 基因玉米后保护酶活性呈显著升高趋势,推测这可能是亚洲玉米螟对转 Bt 基因玉米敏感的原因之一,其具体原因有待进一步分析,但随着取食时间的延长,Bt 杀虫蛋白对虫体损伤的加重,保护酶系统的活力迅速降低,这一点与 Ding 等(2001)的结果相一致。

中肠作为 Bt 的作用部位一直都备受研究者的关注,很多学者认为害虫中肠蛋白酶的变化是产生抗性的主要机制之一(Oppert *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2000; Candas *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004)。本研究结果表明,亚洲玉米螟幼虫体内的总蛋白酶、弱碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的活性在取食转 Bt 基因玉米后随时间的延长总体呈明显降低趋势。Bt 杀虫蛋白被幼虫消化后,引起肠道细胞破坏,pH 值发生变化而影响蛋白酶的活性,加上幼虫拒食后

饥饿的影响(王冬妍等,2005),共同促使中肠蛋白酶活性的下降,同时中肠消化酶的合成分泌减退又促进了拒食作用,加速昆虫的死亡。但强碱性类胰蛋白酶活性明显高于对照,且随时间延长呈升高趋势,周海霞(2002)也报道了甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 取食转 Bt 基因棉后该酶的活性升高,但该酶活性升高的机制还有待于进一步研究。

综上所述,亚洲玉米螟取食转 Bt 基因玉米后,随着机体损伤的加重大多数酶系的活力均呈降低趋势,但乙酰胆碱酯酶和强碱性类胰蛋白酶的活性显著高于对照,推测它们可能与玉米螟对 Bt 的抗性有关,我们将进一步对 Bt 抗性种群的酶系进行深入研究。

参考文献 (References)

- Booth JE, 1961. An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochem. J.*, 79: 516–524.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Candas M, Loseva O, Oppert B, 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Mol. Cell. Proteomics*, 2(1): 19–28.
- Chen CK, 1993. *Insect Physiology and Biochemistry Experiment*. Beijing: China Agriculture Press. 26–29, 124–127. [陈长琨, 1993. 昆虫生理生化实验. 北京: 农业出版社. 26–29, 124–127]
- Ding SY, Li HY, Li XF, Zhang ZY, 2001. Effects of two kinds of transgenic poplar on protective enzymes system in the midgut of larvae of American white moth. *J. Forestry Res.*, 12(2): 119–122.
- Ellman GL, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88–94.
- He KL, Wang ZY, Zhou DR, Wen LP, Song YY, Yao ZY, 2003a. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 96(3): 935–940.
- He KL, Wang ZY, Wen LP, Bai SX, Zhou DR, Zhu QH, 2003b. Field

- evaluation of Asian corn borer control in hybrid of transgenic maize event MON810. *Agricultural Sciences in China*, 2(12): 1363 – 1368.
- Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 2001. Comparison of some detoxification enzyme and midgut protease activities between resistant and susceptible cotton bollworm population to Bt. *Acta Phytophylacica Sinica*, 28(2): 133 – 138. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 2001. 棉铃虫 Bt 抗感种群间数种解毒酶和中肠蛋白酶活性的比较. *植物保护学报*, 28(2): 133 – 138]
- Li HR, Oppert B, Higgins RA, Huang FN, Zhu KY, Buschman LL, 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 753 – 762.
- Li ZZ, Shen HJ, Jiang QG, Ji BZ, 1994. A study on the activities of endogenous enzymes of protective system in some insects. *Acta Entomol. Sin.*, 37(4): 399 – 403. [李周直, 沈惠娟, 蒋巧根, 嵇保中, 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]
- Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McCaughey WH, 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.*, 272: 23473 – 23476.
- Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA, 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*, 8: 939 – 943.
- Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT, 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plant. *Ann. Rev. Entomol.*, 47: 845 – 881.
- Shen JZ, Qian CF, 1994. Effects of sub-lethal dosage of *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae* on SOD and POX activities in *Galleriae mellonella* larvae. *China J. Bio. Contr.*, 10(3): 118 – 122. [申继忠, 钱传范, 1994. 亚致死剂量苏云金杆菌蜡螟亚种对大蜡螟幼虫 SOD 和 POX 活性的影响. *生物防治通报*, 10(3): 118 – 122]
- Song YY, Zhou DR, He KL, 1999. Studies on mass rearing of Asian corn borer: development of a satisfactory non-agar semi-artificial diet and its use. *Acta Phytophylacica Sinica*, 26(4): 324 – 328. [宋彦英, 周大荣, 何康来, 1999. 亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料的研究与应用. *植物保护学报*, 26(4): 324 – 328]
- van Asperen K, 1962. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 8: 401 – 406.
- Wang CZ, Qin JD, 1996. Partial characterization of protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomol. Sin.*, 39(1): 7 – 13. [王琛柱, 钦俊德, 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 DY, Wang ZY, He KL, Cong B, 2005. Feeding behavior of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae on transgenic Bt corn expressing CryIAb toxin. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(2): 258 – 262. [王冬妍, 王振营, 何康来, 丛斌, 2005. 转 Bt 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟幼虫取食行为的影响. *昆虫知识*, 42(2): 258 – 262]
- Zhou DR, He KL, 1995. Asian Corn Borer and Its Integrated Management. Beijing: Golden Shield Press. 1 – 102. [周大荣, 何康来, 1995. 玉米螟综合防治. 北京: 金盾出版社. 1 – 102]
- Zhou HX, 2002. Studies on the Developmental Effects, Physiological and Biochemical Mechanisms of Transgenic CryIAc and CryIA + CpTI Cottons on Beet Armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). MSc Thesis, Shandong Agricultural University. [周海霞, 2002. 转 CryIAc 和 CryIA + CpTI 基因棉花对甜菜夜蛾生长发育的影响及生理生化机制研究. 山东农业大学硕士学位论文]
- Zhu YC, Oppert B, Kramer KJ, McCaughey WH, Dowdy AK, 2000. cDNA sequence, mRNA expression and genomic DNA of trypsinogen from the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Insect Mol. Biol.*, 9(1): 19 – 26.

(责任编辑: 黄玲巧)