



谢勤丹,刘天宇,王强,等.高温对感染 *Wolbachia* 米蛾体内保护酶和生殖的影响[J].黑龙江农业科学,2021(1):59-63.

高温对感染 *Wolbachia* 米蛾体内保护酶和生殖的影响

谢勤丹,刘天宇,王 强,王泽燃,黎金泽,李明睿,刘向涛,张海燕

(黑龙江八一农垦大学 农学院,黑龙江 大庆 163316)

摘要:为揭示高温处理对感染 *Wolbachia* 米蛾生殖发育及生理特性的影响,本研究测定不同温度和时间组合处理条件下米蛾体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)三种保护酶的活性,同时在室温 25 ℃和高温 31 ℃下,观察米蛾的孵化率、化蛹率、羽化率、雌蛾率、产卵量和发育历期等指标,统计米蛾的生物学特性。结果表明:在室温和高温条件下,米蛾的孵化率、化蛹率、羽化率、雌蛾率均无显著差异,但严重影响了米蛾成虫的产卵量和发育历期。而在 31 ℃处理条件下,其体内 SOD 含量逐渐升高,35 ℃条件 CAT 含量急剧下降,在 25 ℃处理条件下其保护酶系统处于平衡状态。高温会影响感染 *Wolbachia* 米蛾的发育历期,产卵量和繁殖量并且会破坏米蛾体内保护酶的平衡,高温对感染 *Wolbachia* 米蛾的生殖方式影响不显著。

关键词: *Wolbachia*; 米蛾; 保护酶; 高温

米蛾(*Corcyra cephalonica* Stainton)属于鳞翅目(Lepidoptera)蜡螟科(Galleriidae),是一种常见的仓储害虫,主要为害大米、稻谷等^[1]。米蛾饲养简便,可在室内终年繁殖,在生物防治当中,米蛾卵起到非常重要的作用,是多种卵寄生性天敌的寄主,其中应用最广的赤眼蜂就以米蛾卵为

中间寄主,米蛾卵可繁育多种赤眼蜂^[2-3]。同时一些捕食性天敌,如东亚小花蝽和捕虱管蓟马饲养时对营养的需求完全可由米蛾卵提供^[4-6]。

昆虫在面对环境温度变化时,为了生存,体内会产生一系列的保护机制^[7]。昆虫细胞内存在自由基,具有很强的氧化能力,正常情况下,生物细胞里的自由基含量较低,当外界环境处于逆境时,其含量增加,此时昆虫的自由基清除系统,便会清除这些自由基,维持体内的离子平衡。其中 SOD 酶、CAT 酶和 POD 酶是重要的清除酶,三者相互协调可维持昆虫体内的自由基达到平衡状态。米蛾和大多数昆虫一样体内存在着保护酶系统,且不同温度对不同虫态体内保护酶有不同的影响。

收稿日期:2020-10-28

基金项目:黑龙江八一农垦大学人才支持计划项目(ZRCLG 201901);黑龙江八一农垦大学杂粮特色学科项目;黑龙江八一农垦大学大学生创新创业项目(XC2020014)。

第一作者:谢勤丹(1998—),女,在读学士,专业为植物保护。E-mail:2584921193。

通信作者:张海燕(1979—),女,博士,副教授,从事农业昆虫与害虫防治研究。E-mail:zhanghy51@126.com。

Abstract: In order to promote the application of *Xanthium sibiricum* stem and leaf extract in the development of biopesticides, the aim of this study effects of extracts from *Xanthium sibiricum* on toxicity activity of *Aphis glycines* the ultrasonic extraction method was used to extract stem and leaf of *Xanthium sibiricum* from May to September. The toxicity activity and potted control effect of extracts from different periods *Xanthium sibiricum* on *Aphis glycines* were studied. The results showed that the extraction rate of *Xanthium sibiricum* stem and leaf extracts from May to September was between 13.98% and 23.50%, the highest extraction rate was on July 27th, the second one was on August 10th. The toxicity activity was between 56.12% and 84.92%, the highest was on August 10th. The best potted control effect was on August 10th which was 78.15%. Considering the extraction rate, toxicity activity and the control effect of *Aphis glycines*, it could be concluded that the best date of *Xanthium sibiricum* extracts was August 10th. Although the concentration of 40 mg·mL⁻¹ was less effective than that of Pymetrozine in the field control of *Aphis glycines*, the 7 days after treatment control effect reached 72.54%, which was suitable for the field biological control of *Aphis glycines*.

Keywords: *Aphis glycines* control; extract of *Xanthium sibiricum*; toxic activity

沃尔巴克氏菌(*Wolbachia*)是自然并分布最为广泛的一种共生菌,影响所寄生生物的生殖和发育。本试验旨在测定米蛾体内 *Wolbachia* 的存在及揭示高温处理对感染 *Wolbachia* 的米蛾生殖发育及生理特性的影响,以及高温对米蛾体内保护酶的影响。着重研究室温 25 ℃ 和高温 31 ℃ 对米蛾成虫产卵及发育历期的影响,明确温度对米蛾孵化率、化蛹率、羽化率、产卵量及成虫寿命等指标和 SOD、CAT 和 POD 酶活性的影响,进而确定米蛾成虫产卵和快速繁殖的最佳温度,进一步为智能化繁育米蛾和利用米蛾卵繁殖各类天敌,以及共生菌的生防潜能等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

米蛾卵、幼虫、蛹和成虫。饲料及配比:77% 麦麸、10% 玉米面、10% 面粉、3% 奶粉。

1.2 方法

1.2.1 米蛾体内 *Wolbachia* 的检测 利用 *wsp* 基因的 PCR 特异性扩增方法^[8],检测米蛾体内是否感染 *Wolbachia*。

1.2.2 米蛾卵培养温度处理 本试验设室温 25 ℃ 和高温 31 ℃ 两个处理,将黑龙江八一农垦大学农学院普通昆虫实验室新产出的米蛾卵,分别装入直径为 2 cm 的圆柱形玻璃管中,加入足量饲料,任其生长发育,置于 25 和 31 ℃ 的人工气候箱中恒温培养,设定湿度 RH 均为 75%,光照为 L:D=12 h:12 h。10 粒为一组,每个处理 3 次重复。

1.2.3 米蛾成虫培养温度处理 选取新羽化米蛾成虫放入装有新鲜饲料的饲养瓶每瓶 10 头,将饲养瓶置于智能人工气候箱,光照时间 14 h·d⁻¹,湿度 70%,温度为 25,30 和 35 ℃,分别处理 12,24,48 和 72 h,以养虫室恒温 25 ℃ 饲养的米蛾成虫作为对照。处理完的米蛾放入 -80 ℃ 冰箱保存。

1.2.4 测定项目及方法 待孵化后统计孵化率,化蛹后统计化蛹率并将蛹装入自制养虫笼,待羽化后,统计羽化率,雌蛾率,放入同批异性米蛾任其交配后自由产卵,每日收集米蛾卵,统计单雌产卵量。具体计算公式如下:

$$\text{孵化率}(\%) = \frac{\text{孵化数}}{\text{总数}} \times 100$$

$$\text{化蛹率}(\%) = \frac{\text{化蛹数}}{\text{总数}} \times 100$$

$$\text{羽化率}(\%) = \frac{\text{羽化数}}{\text{总数}} \times 100$$

$$\text{雌蛾率}(\%) = \frac{\text{羽化出雌数}}{\text{羽化数}} \times 100$$

SOD 的测定采用 NBT 还原抑制法^[9-10]:第一步,取成虫 3 头于预冷的研钵中,加 1 mL 酶提取缓冲液,在冰浴上研磨成匀浆,加缓冲溶液使终体积为 5 mL。在 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 左右,上清液即为 SOD 提取液。显色反应取 3 mL 反应液(0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲溶液,130 mmol·L⁻¹ Met,750 μmol·L⁻¹ NBT,100 μmol·L⁻¹ EDTA-Na₂,100 μmol·L⁻¹ EDTA-Na₂,蒸馏水,20 μmol·L⁻¹ 核黄素,酶液),取 2 支试管作为对照试管加入缓冲溶液取代酶液,取其平均值,混匀后,将 1 支对照管置于暗处,其他试管置于 4 000 lx 日光下反应 15~20 min,反应温度 25~35 ℃ 至反应结束,以暗处的对照试管为空白,分别测定其它试管吸光值,测定波长为 560 nm。

POD 的测定采用愈创木酚法^[11-12]:粗酶液的提取,取米蛾成虫 3 头,加 20 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄ 5 mL,于研钵中研磨成匀浆,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,收集上清液于冷处,所得的残渣再用 5 mL KH₂PO₄ 溶液提取一次,合并两次上清液。酶活性的测定,一个试管入反应混合液 3 mL, KH₂PO₄ 1 mL,作为校零对照,另外加入反应混合液 3 mL,上述酶液 1 mL(如果酶活性过高可适当稀释,5~10 倍),立即开启秒表计时,于 470 nm 测 OD 值,每隔 1 min 读 1 次值,读 3 min,以为每分钟 OD 变化值表示酶活性的大小,以 $\Delta OD \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ 蛋白质表示。

CAT 的测定采用过氧化氢分解法^[13-14]:酶液提取,取米蛾成虫 3 头加入 2~3 mL 4 ℃ 下预冷的 pH7.8 的磷酸缓冲液少量,研磨成匀浆,转移到 25 mL 容量瓶中,用该缓冲液冲洗研钵数次,合并冲洗液至容量瓶并定容。放置冰箱中静置 10 min,取上清液于 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,上清液即为过氧化氢酶粗提取液,5 ℃ 保存。酶活性测定,每个处理组对应两只试管分别标记为 S、S₀,每支试管中 2.7 mL 反应液包括粗酶液、pH7.8 磷酸缓冲液、蒸馏水。将 S₀ 对照管在沸水浴中煮 1~2 min 以杀死酶液,冷却。然后将所有试管放在 25 ℃ 下预热,逐个加入 0.3 mL 0.1 mol·L⁻¹ 的 H₂O₂,每管加完立即计时,并迅速倒入石英比色杯,在 240 nm 下测定吸光值,每隔

1 min读一次,共测定 4 min。以蒸馏水为空白对照。

1.2.5 数据分析 采用 SPSS 18.0 软件进行数据的统计分析,数据均表示为“平均数±标准误”,Duncan 氏检验方法进行多重比较和差异显著性分析。

2 结果与分析

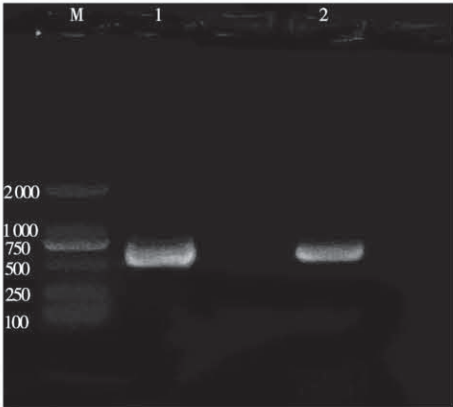
2.1 米蛾体内 *Wolbachia* 的检测

利用 *wsp* 基因的一对通用引物(81 F,691 R)成功地从米蛾的总 DNA 中扩增到一段 *wsp* 基因片段,说明米蛾幼虫及成虫均被 *Wolbachia* 感染(图 1)。

2.2 两种温度下米蛾的发育历期

由表 1 可知,25 ℃下米蛾的卵期为 5 d,幼虫期为 31.3 d,蛹期为 9.3 d,成虫期为 9.9 d,生命周期为 55.5 d;31 ℃下米蛾的卵期为 4 d,幼虫期

为 22.9 d,蛹期为 8 d,成虫期为 9.6 d,生命周期为 44.5 d。米蛾在 31 ℃下的卵期、幼虫期、蛹期、成虫期及生命周期均小于 25 ℃,幼虫期和生命周期差异极显著,蛹期差异显著。



M: DL 2000 DNA Marker; 1: 米蛾幼虫; 2: 米蛾成虫; 3: ddH₂O

图 1 米蛾体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因特异性扩增

表 1 米蛾在两种温度下各虫态发育历期

温度/℃	卵期/d	幼虫期/d	蛹期/d	成虫期/d	生命周期/d
25	5	31.3±0.96**	9.3±0.30*	9.9±0.55	55.5±0.90**
31	4	22.9±0.53	8.0±0.26	9.6±0.79	44.5±0.50

注:表中数据为“平均值±标准误”。* 和 ** 表示两个温度间差异显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。下同。

由表 2 可知,25 ℃下米蛾的孵化率为 0.90%,化蛹率为 0.67%,羽化率为 0.80%,雌蛾率为 0.59%,产卵量为 176.83 粒;31 ℃下米蛾的孵化率为 0.83%,化蛹率为 0.63%,羽化率为

0.87%,雌蛾率为 0.54%,产卵量为 343.5 粒。米蛾在 31 和 25 ℃下孵化率、化蛹率、羽化率和雌蛾率没有明显差异,但 31 ℃下产卵量显著高于 25 ℃。

表 2 米蛾在两种温度下的生殖特性

温度/℃	孵化率/%	化蛹率/%	羽化率/%	雌蛾率/%	产卵量/粒
25	0.90±0.06	0.67±0.09	0.80±0.06	0.59±0.02	176.83±81.18*
31	0.83±0.03	0.63±0.07	0.87±0.03	0.54±0.02	343.5±138.89

2.3 温度及时间处理下米蛾虫体 SOD 活性变化

由表 3 可知,30 ℃条件下米蛾虫体 SOD 活性随着处理时间的延长,逐渐上升,到 72 h 时,达到最大值 203.63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,显著高于室温 25 ℃下 72 h 处理的值。35 ℃条件下 SOD 活性随着处理时间的延长,也呈现逐渐上升的趋势,当处理 48 h 时,SOD 活性达到 163.52 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,显著高于 25 ℃相同处理时间的值,处理 72 h 时,米蛾虫体 SOD 活性达到最高值,为 219.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,显著高于

25 ℃相同处理时间的值。在室内恒温 25 ℃条件下,随着处理时间的延长,米蛾体内 SOD 活性并不变化不显著。

2.4 温度及时间处理下米蛾虫体 CAT 活性变化

由表 4 可知,30 ℃处理时,分别在 24 和 72 h 出现两个峰值,且 72 h 与 25 ℃时差异显著;25 ℃室内恒温条件下,随着处理时间的延长,米蛾体内 CAT 活性在一定范围内波动,差异不显

著;35 ℃时 CAT 活性随着处理时间的延长发生明显的变化,在处理达到 48 h 时出现峰值,为 93.76 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,但各处理时间下均与 25 ℃处理差异不显著。

表 3 不同温度及时间处理下米蛾虫体 SOD 活性变化 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

温度/℃	12 h	24 h	48 h	72 h
25	88.25±61.36 cdef	63.17±21.49 def	59.22±19.28 def	74.75±10.45 def
30	32.06±10.81 ef	63.06±15.15 def	112.39±28.47 cde	203.63±21.09 ab
35	87.97±37.64 cdef	132.95±10.85 bcd	163.52±13.72 abc	219.67±13.95 a

注:不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

表 4 不同温度及时间处理下米蛾虫体 CAT 活性变化 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

温度/℃	12 h	24 h	48 h	72 h
25	87.62±8.54 ab	68.55±5.53 abc	74.16±10.29 abc	59.1±8.85 bc
30	75.79±8.14 abc	90.41±1.48 ab	82.76±17.03 abc	93.15±4.23 a
35	69.27±12.78 abc	52.20±8.14 c	93.76±11.71 a	63.60±9.13 abc

2.5 温度及时间处理下米蛾虫体 POD 活性变化

由表 5 可知,25 ℃条件下连续处理不同时间,米蛾虫体 POD 活性无明显变化,只有小范围的波动,30 ℃时米蛾虫体 POD 活性与 25 ℃下差异不显著,当处理时间延长时,POD 含量出现先增高后降低的现象,最高值是在处理 24 h 时,

POD 活性为 3.43 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,随后逐渐降低,最低值是处理 72 h,为 1.27 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。35 ℃条件下,处理 12 h 米蛾虫体 POD 活性为 6.30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,与 25 ℃下差异显著,处理时间延长米蛾虫体 POD 活性下降,与 25 ℃无显著差异。

表 5 不同温度及时间处理下米蛾虫体 POD 活性变化 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

温度/℃	12 h	24 h	48 h	72 h
25	2.09±2.61 bc	1.50±1.32 bc	1.50±0.97 c	2.42±1.20 abc
30	2.26±2.12 bc	3.43±3.24 abc	2.89±2.23 abc	1.27±0.85 bc
35	6.30±5.10 a	1.56±1.24 bc	3.99±2.81 abc	1.89±1.56 bc

3 结论与讨论

研究表明,高温对感染 *Wolbachia* 的赤眼蜂的生殖方式和体内 *Wolbachia* 的滴度均有影响,会导致其孤雌产雌,体内 *Wolbachia* 的滴度改变^[15]。在 25 ℃和 31 ℃下对比分析得出,31 ℃条件会使米蛾缩短生命周期,增加产卵量,从而增加繁殖量,加快繁殖速度。但高温对感染 *Wolbachia* 的米蛾的生殖方式没有明显的影响。导致该现象的原因可能为以下几点:第一,高温会促使米蛾加快新陈代谢,缩短发育和生长历程。第二,米蛾体内 *Wolbachia* 含量偏低,因此对米蛾的生殖方式调控影响不显著。Fridovich^[16]把 SOD、POD 和 CAT 3 种酶称为保护酶系统,本试验通过对米蛾体内 SOD、POD 和 CAT 3 种酶的检测

过程中发现,米蛾体内存在自由基和清除自由基的保护酶系统。在 25 ℃条件下,米蛾体内 SOD、POD 和 CAT 3 种酶处于相对稳定状态,在一定幅度内波动。对米蛾进行高温处理后,体内的 SOD 与室温相比变化明显,在一定范围内温度增加使米蛾体内 SOD 活性增强。米蛾体内 CAT 含量则随温度处理出现了较大的波动,高温对 CAT 的活性具有明显的抑制作用。而随着温度的增加,处理时间的延长,POD 含量无明显变化,表明温度对 POD 的活性影响不太显著。

综上所述,高温对感染 *Wolbachia* 米蛾体内保护酶有显著影响,高温会使米蛾生长周期缩短,同时,也会使米蛾体内保护酶系统遭到一定程度上的破坏,保护酶失衡。研究结果对于今后开展

米蛾及共生菌之间研究具有重要参考意义。

参考文献:

- [1] 李根君,姜峰立,郭建军.米蛾的形态及习性观察[J].应用昆虫学报,1982(6):22-24.
- [2] 苟雪琪.中国赤眼蜂的研究与利用[J].昆虫天敌,1986,8(2):113-120.
- [3] 宋凯,何运转,郑礼.麦蛾卵龄对玉米螟赤眼蜂寄生选择及后代质量指标的影响[J].中国生物防治学报,2014,30(5):618-623.
- [4] 杨丽文,王甦,张志勇,等.米蛾卵饲养东亚小花蝽的关键点研究[J].环境昆虫学报,2014,36(6):971-977.
- [5] 周伟儒,王韧,邱世邦.用黄豆芽作产卵植物繁殖东亚小花蝽[J].中国生物防治通报,1991,7(1):7-9.
- [6] 黎明,梁伟光,熊锦君,等.用米蛾卵饲养捕虱管蓟马[J].昆虫天敌,1995,17(2):55-58.
- [7] 郭俊杰,王勇,季清娥,等.高温对阿里山潜蝇茧蜂体内保护酶系活性的影响[J].热带作物学报,2013,34(6):1166-1169.
- [8] 丛斌,付海滨,王翠敏,等.米蛾体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列测定与系统发育分析[J].昆虫学报,2005,48(5):815-818.
- [9] 王学奎.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2006:172-173.
- [10] 李玲.植物生理学模块实验指导[M].北京:科学出版社,2009:98-100.
- [11] 王学奎.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2006:169-170.
- [12] 刘萍,李明军.植物生理学实验技术[M].北京:科学出版社,2007:128-130.
- [13] 张志良,翟伟菁.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2004:123-124.
- [14] 李玲.植物生理学模块实验指导[M].北京:科学出版社,2009:97-98.
- [15] 陈茜,王丽艳,杨志强,等.温度通过影响 *Wolbachia* 滴度调控赤眼蜂生殖方式[J].昆虫学报,2016,59(4):464-471.
- [16] Fridovich I. Oxygen is toxic [J]. Bioscience,1977,27(7):46271.

Effects of High Temperature on Protective Enzymes and Reproduction in Infected with *Wolbachia*

XIE Qin-dan, LIU Tian-yu, WANG Qiang, WANG Ze-ran, LI Jin-ze, LI Ming-rui, LIU Xiang-tao, ZHANG Hai-yan

(College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to reveal the effect of high temperature on the reproductive development and physiological characteristics of rice moth infected with *Wolbachia*, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) protective enzymes were measured under different temperature and time combinations, to explore the influence of high temperature on rice moth protective enzyme system, at the same time under room temperature 25 °C and 31 °C, to observe the hatchability of rice moth, pupa rate and eclosion rate, rate of female moth, indices such as spawning and development period, estimated the biological characteristics of the rice moth. The results showed that there was no significant difference in hatching rate, pupation rate, emergence rate and female moth rate under room temperature and high temperature conditions, but it had a serious impact on the amount of eggs laid by the adults and the development duration of the moth. At 31 °C processing conditions, its body SOD content increased, content of 35 °C condition CAT fell sharply, under the condition of 25 °C to deal with the protective enzyme system in a state of balance, high temperature would affect the developmental duration, spawning quantity and fecundity of the infected *Wolbachia*, and would also destroy the balance of protective enzymes in the body of the infected *Wolbachia*, while high temperature had little effect on the reproductive pattern of the infected *Wolbachia*.

Keywords: *Wolbachia*; rice moth; protective enzyme; high temperature