

Effect of the 2 Enzyme Activity of Yellow Green of *Metarhizium anisopliae* on *Myzus persicae*

Chuanfu Kuang¹, Dexin Chen², Shun Zhang²

¹Hunan Tobacco Companies Chenzhou Company, Chenzhou Hunan

²Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao Shandong
Email: kcf601@163.com

Received: Jul. 23rd, 2016; accepted: Aug. 16th, 2016; published: Aug. 19th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

We study the effect of green to yellow green of *Metarhizium anisopliae* on *Myzus persicae* GST and AChE in the two enzymes. The results showed that after 24 h, *Myzus persicae* in AChE activity dropped sharply until 40 h reached the lowest inhibition rate for 52.81%, followed has been maintained at the level; *Myzus persicae* GSTs activity after infected with bacteria and 40 h, the activity decreased rapidly until 56 h reduced to a minimum. The inhibition rate was 38.91% and remained at the level.

Keywords

Yellow Green of *Metarhizium anisopliae*, *Myzus persicae*, Enzyme Activity

黄绿绿僵菌对桃蚜2种酶活性的影响

匡传富¹, 陈德鑫², 张 顺²

¹湖南省烟草公司郴州市公司, 湖南 郴州

²中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛

Email: kcf601@163.com

收稿日期: 2016年7月23日; 录用日期: 2016年8月16日; 发布日期: 2016年8月19日

摘要

研究了黄绿绿僵菌对桃蚜GSTs和AChE 2种酶系的影响,结果表明:24 h以后,桃蚜体内AChE的活力急剧下降,直到40 h时达到最低,抑制率为52.81%,其后一直维持在该水平;桃蚜体内GSTs的活力在染菌40 h后,其活力快速下降,直到56 h降到最低,抑制率为38.91%,并维持在该水平。

关键词

黄绿绿僵菌, 桃蚜, 酶活性

1. 引言

昆虫病原真菌穿透寄主体壁进入血腔中,必然会遇到昆虫防御系统的抵抗,即昆虫受到刺激后会产生应激反应,引起的一系列代谢变化[1]。外源物进入昆虫体内后会与多种代谢酶系发生作用,其中GSTs等解毒酶是在昆虫体内代谢过程中起着重要作用的酶类,AChE是有机磷杀虫剂和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标,这类酶在对外源化合物的解毒代谢方面起着重要作用,药剂对上述酶系的影响均会造成昆虫代谢紊乱而影响正常的生理生化过程。

本研究以桃蚜为试虫,研究了黄绿绿僵菌对GSTs和AChE 2种酶系的影响,以期从生理生化角度探索提取物对试虫作用的靶标,及昆虫的解毒机制,阐述黄绿绿僵菌的杀虫作用机理,为其开发应用提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 供试材料

黄绿绿僵菌 Mf82 菌株是从褐飞虱罹病虫体分离纯化后保存于昆虫病理实验室的菌种。在SDAY (SDAY 配方含4%葡萄糖、1%蛋白胨、1%酵母粉及2%琼脂)斜面上接种培养10 d左右,培养条件:置于4℃冰箱中保存备用。用于饲养桃蚜的甘蓝叶片,采自烟草所温室大棚内播种的甘蓝。

2.2. 供试昆虫

桃蚜采自即墨试验农场,在烟草所的大棚温室内所栽的烟草上饲养繁殖3代以上,选取大小一致,活动正常的的蚜虫供试。

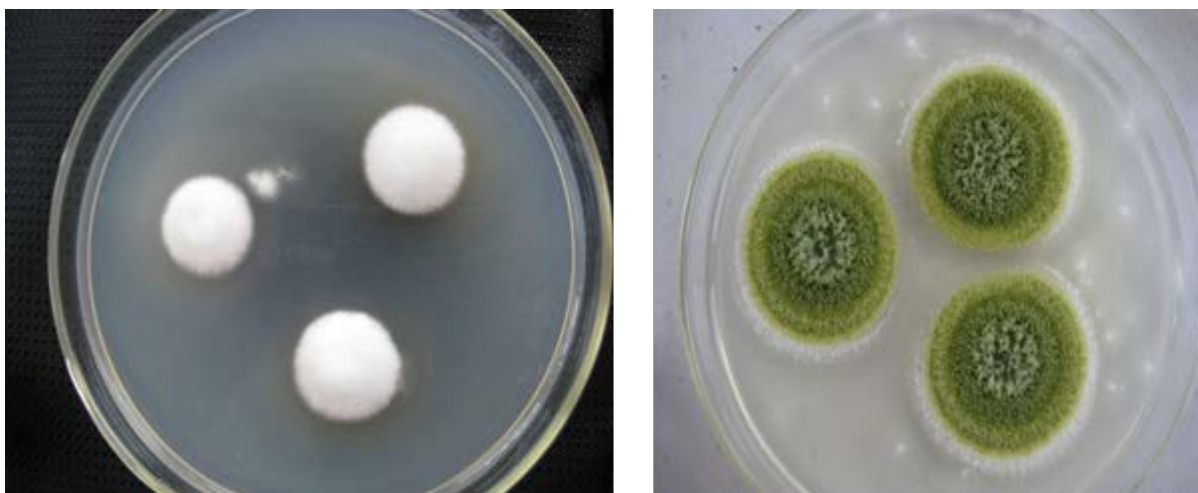
2.3. 试剂与仪器

甲醇(Methanol),上海振企化学试剂有限公司生产;乙酸乙酯(Ethylacetate),广东汕头市西陇化工厂生产;丙酮(Acetone),上海凌峰化学试剂有限公司。所有溶剂均为分析纯。离心机(TGL8 Rrefrigerated Centrifuge):Hema公司;分光光度计(DU730):BECKMAN COULTER公司;恒温水浴锅(B-260):上海亚荣生化仪器公司;冰箱(ULTRALOW):SANYO公司;光照培养箱。移液枪,培养皿,广口瓶,毛笔等。

乙酰乙碱酯酶测定试剂盒、GSTs测定试剂盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒。

2.4. 黄绿绿僵菌孢子悬浮液的配制

将保存在冰箱中的供试菌株转接马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板培养基上(图1), $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、12 L:12 D的光照条件下培养7 d,待真菌充分产孢后,用灭菌的接种环轻轻将分生孢子粉刮到盛有5 mL 0.05%的



筛选出一种具有高效寄生烟蚜的生防菌，绿僵菌菌株 *Metarhizium anisopliae*

Figure 1. PDA culture medium, colony shape observation

图 1. PDA 培养基上培养，菌落形状观察

Tween-80 湿润剂的三角瓶中，在涡旋混合器上充分振荡 10 min，待链珠状分生孢子断裂和分散后，以双层无菌纱布过滤菌液，获得孢子悬浮液母液。用血球计数板计数每毫升母液的分生孢子数，然后按比例稀释，配制成浓度为 1.0×10^8 个孢子/mL 的孢子悬浮液供试。

2.5. 黄绿绿僵菌对桃蚜的接菌方法

用干净的小毛笔从大棚里饲养的桃蚜中采集大小一致的无翅若蚜，放入有甘蓝叶片的培养皿($d = 12$ cm)中，用手动喷雾器将浓度为 1.0×10^8 个孢子/mL 的孢子悬浮液均匀喷于供试虫体，每皿喷 1.0 mL 孢子液，以 0.05% 的 Tween-80 水溶液处理作为空白对照。用保鲜膜将培养皿口封住，用大头针在其上刺约 20 个小孔，既透气又可防止桃蚜逃逸。将处理的桃蚜置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 80% 左右、光周期为 L:D = 14:10 h 的恒温光照培养箱内饲养。每次接菌的桃蚜数约为 100 头，重复 3 次。于处理后每间隔 8 h 取样一次，共取 8 次，以供制取酶液。

2.6. 桃蚜体内酶活性测试

2.6.1. 酶液的制备

试虫先用生理盐水漂洗 2~3 次。准确称取干净的待测试虫重量，按重量体积比(1:9)加生理盐水制成 10% 的组织匀浆，在 4°C 下以 3500 r/min 离心 10 min，取上清液作为待测酶液。

以上酶液提取都是在冰浴中进行，所用生理盐水、匀浆器都需要进行遇冷处理，以防止酶失活。所提酶样均放入 -20°C 冰箱内储藏备用。

2.6.2. 酶活性的测定

AChE、GSTs 和蛋白质含量的具体测定方法按照南京建成生物工程公司生产的试剂盒说明书进行。每处理重复 3 次。

3. 结果与分析

3.1. 黄绿绿僵菌对桃蚜 AChE 活力的影响

用 108 个孢子/mL 的黄绿绿僵菌孢子悬浮液处理桃蚜，处理后每隔 8 h 取样一次，共取 8 次，测定桃

蚜体内 AChE 的活性变化情况。由图 2 可以看出, 在 24 h 内, 处理组的蚜虫 AChE 的活力与对照无明显差异。24 h 以后, 其活力急骤下降, 直到 40 h 时达到最低, 抑制率为 52.81%, 其后一直维持在该水平。

3.2. 黄绿绿僵菌对桃蚜 GSTs 活力的影响

从图 3 可见, 蚜虫体内 GSTs 的活力在染菌后的 40 h 内, 与对照相比无明显变化, 但从 40 h 后, 其活力快速下降, 直到 56 h 降到最低, 抑制率为 38.91%, 并维持在该水平。

相比之下, 黄绿绿僵菌对桃蚜体内 AChE 活性的抑制作用更大, 抵制速度也更快。黄绿绿僵菌对桃蚜体内这两种酶活性的抑制是由于菌体本身侵染造成的, 还是其代谢产物或者说绿僵菌毒素造成的? 结合毒力测定现象和酶活测定结果推测, 后一种的可能性更大, 或者至少是二者共同作用的结果。在毒力测定中桃蚜的死亡速度较快, 在染菌 48 h 甚至更早的时候后即出现死亡, 对 AChE 活性的抑制速度较快, 抑制程度较高, 这些现象或结果说明, 黄绿绿僵菌的毒素在对蚜虫的致死作用中起着重要作用。因此, 该菌作为蚜虫的生防菌有着重大潜力。

4. 小结与讨论

桃蚜一般营全周期生活, 也可以一直营孤雌生殖的不全周期生活, 比如在北方地区的冬季, 可在温室内的茄果类蔬菜上继续繁殖为害。桃蚜的繁殖很快, 华北地区一年可发生 10 余代, 长江流域一年发生 20~30 代[2]。本试验采用烟草上饲养繁殖 3 代以上的成蚜。

张仙红(2006)等[3]研究表明, 被玫烟色拟青霉 *Paecilomyces fumosoroseus* 侵染的 3、4 龄菜青虫体内

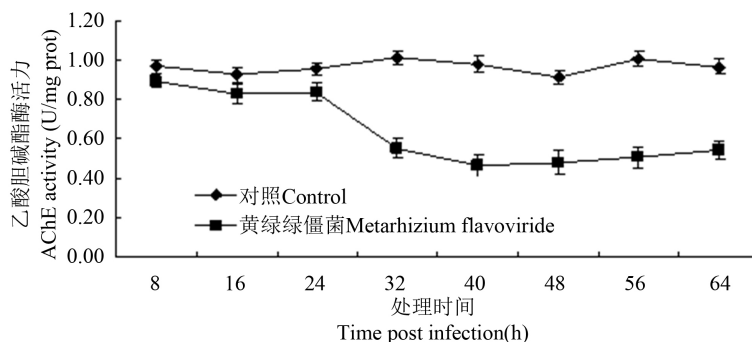


Figure 2. Infected by *Metarhizium* green peach aphid AChE activity *in vivo*

图 2. 桃蚜感染黄绿绿僵菌后体内 AChE 活性的变化

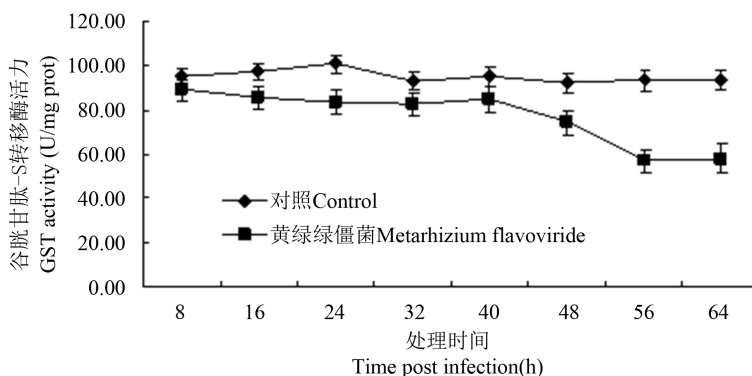


Figure 3. Infected by *Metarhizium* green peach aphid GSTs activity *in vivo*

图 3. 桃蚜感染黄绿绿僵菌后体内 GSTs 活性的变化

GSTs 活力在感病前期显著高于同期未感染的菜青虫，而在感病后期明显低于同期未感染的菜青虫。苏筱雨等研究显示，感染球孢白僵菌后的桑天牛幼虫，其体内的 GSTs 活性则表现出先刺激后抑制的作用，而 AChE 活性影响则呈先抑制再激活再抑制再激活的趋势。王龙江(2010)等[4]研究发现，红火蚁感染白僵菌后，AChE 的比活力呈先上升后下降的趋势，在接种后 36 h 时最高，之后不断下降。

本实验结果表明，黄绿绿僵菌处理对桃蚜 AChE 和 GSTs 活性的影响均表现为侵染初期抑制作用不明显，随着处理时间的延长均出现显著的抑制作用，并保持在较低水平，但最早出现抑制效应和达到最大抑制效应的时间不同，对于 AChE 分别出现在处理后的 32 h 后和 40 h；而对于 GSTs 则分别出现在处理后的 48 h 和 56 h。从毒力测定试验观察，黄绿绿僵菌处理后 48 h，桃蚜开始逐渐死亡。这可能是因为在处理后第 24 h 黄绿绿僵菌菌丝还没有侵染到桃蚜体内，48 h 以后黄绿绿僵菌菌丝侵染桃蚜体内，并在桃蚜体内迅速生长增殖，黄绿绿僵菌菌丝造成虫体组织结构的破坏，显著抑制了 AChE 和 GSTs 的活力，最终导致桃蚜的死亡。

毒测定显示，黄绿绿僵菌对桃蚜的入侵在 48 h 后即可引起桃蚜死亡，这既可能是由于菌丝的入侵抑制其体内重要代谢酶的活性，更可能是黄绿绿僵菌产生的毒素造成的。黄绿绿僵菌的入侵导致桃蚜体内 AChE 和 GSTs 的活力的活性受到抑制，是否与黄绿绿僵菌在入侵过程中伴随着毒素的产生有关？其具体机制还有待于进一步研究。这对于以后用黄绿绿僵菌对桃蚜进行生物防治有重要意义。

基金项目

湖南省烟草公司重点科研项目(项目编号：14-16ZDAa02)资助。

参考文献 (References)

- [1] 李建庆, 张永安, 张星耀, 等. 昆虫病原真菌毒素的研究进展[J]. 林业科学研究, 2003(2): 114-120.
- [2] 西北农业大学. 农业昆虫学第二版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [3] 张仙红, 王宏民, 李文英, 等. 菜青虫感染玫烟色拟青霉后血淋巴蛋白质含量及几种保护酶活力的变化[J]. 昆虫学报, 2006(2): 66-70.
- [4] 王龙江, 吕利华, 谢梅琼, 等. 红火蚁感染白僵菌后体内保护酶和酯酶活性的变化[J]. 华中农业大学学报, 2010(3): 32-36.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>