



孔艳艳, 赵惠燕. 高压静电场胁迫对各代麦长管蚜体重及抗氧化酶基因表达的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (2): 387–396.

高压静电场胁迫对各代麦长管蚜体重及抗氧化酶基因表达的影响

孔艳艳, 赵惠燕*

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为探究高压静电场对麦长管蚜的影响, 设置不同剂量 (4 kv/cm-20 min、5 kv/cm-40 min) 的高压静电连续处理小麦种子和出生 12 h 内的麦长管蚜若虫 40 代, 以未经上述处理的小麦种子和蚜虫为对照; 通过 qRT-PCR 的方法对处理至第 4, 11, 21, 31, 40 代的麦长管蚜进行抗氧化酶基因表达量的测定, 并测定相近世代麦长管蚜的相对日均体重增长率。结果表明: *CuZnSOD*、*MnSOD*、*POD* 3 种抗氧化酶基因均在第 4 代和第 40 代上调, 第 11 ~ 31 代基因表达不显著或呈下调模式; 且第 4 代麦长管蚜在 5 kv/cm-40 min 剂量下, 上述 3 种酶基因上调最显著, 而在第 40 代麦长管蚜在 4 kv/cm-20 min 剂量下, 酶基因上调最显著。相对日均体重增长率随世代变化趋势呈先升高后降低趋势, 产生变化的关键世代与酶基因一致。长期胁迫下, 随世代延长麦长管蚜抗氧化酶基因表达存在差异, 且与体重变化差异相符, 这为麦长管蚜随世代增加对高压静电场胁迫调整适应和防御规律的研究提供参考。

关键词: 麦长管蚜; 高压静电场; 抗氧化酶; 基因表达水平; 相对日均体重增长率

中图分类号: Q965; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 02-0387-10

Effect of high voltage electrostatic field (HVEF) stress on weight and expression of antioxidant enzyme gene in *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae)

KONG Yan-Yan, ZHAO Hui-Yan* (Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shanxi Province, China)

Abstract: In order to study the effect of high voltage electrostatic field on *Sitobion avenae* (Fabricius), the wheat seeds and *S. avenae* nymphs (born within 24 h) were treated for 40 generations by exposing them to an HVEF at 4 kv/cm-20 min intensity for 20 min and at 5 kv/cm intensity for 40 min, respectively, and without treatment (0 kv/cm) as control. Gene expression levels of *S. avenae* were measured by qRT-PCR of 4th, 11th, 21st, 31st, 40th generation, and mean relative growth rate (MRGR) of *S. avenae* was determined in these similar generations. The expression of three antioxidant enzymes (*CuZnSOD*, *MnSOD*, *POD*) genes were up-regulated in the 4th and 40th generation, and was not significant and even down-regulated in the 11th and 31st generation. Moreover, the above three enzyme genes were most significantly up-regulated at the dose of 5 kv/cm-40 min in the 4th generation of *S. avenae*, while enzyme gene was most significantly up-regulated at the dose of 4 kv/cm-20 min in the 40th generation of *S. avenae*. The MRGR increased first and then decreased with generation, and the key generation to change was consistent with the enzyme gene. There were differences in the expression of antioxidant enzymes and

基金项目: 高校博士点基金项目 (20130204110004); 国家自然科学基金 (39970112, 30470268)

作者简介: 孔艳艳, 硕士, 主要研究方向为昆虫生态与害虫防治, E-mail: conyanyan@163.com

* 通信作者 Author of correspondence: 赵惠燕, 博士, 主要研究方向为昆虫生态学与害虫防治, E-mail: zhaohy@nwfu.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-03-11; **接受日期** Accepted: 2020-05-21

MRGR of *S. avenae* with generation increasing when exposed under HVEF, and it was proved that *S. avenae* had a certain adjustment and re-defense to long-term HVEF stress for maintain the survival evolution.

Key words: *Sitobion avenae*; high voltage electrostatic field (HVEF); antioxidant enzyme; gene expression level; mean relative growth rate

地球上存在的静电场与生物的生长发育密切相关,近年,随着各类高压电力工程建设的增加以及高压静电场在农业领域(如静电喷雾、静电保鲜、静电育种)等方面的应用,高压静电的增强是否会对生物的生长发育产生影响引起研究人员的重视(Murr, 1966; 吴春艳等, 2004; Zhao *et al.*, 2011)。众多学者从农业领域开展高压静电剂量以及正负生物效应的研究,以期探究出高压静电在农业生产中所能产生的最大生物学效应(王淑惠等, 1991; Schmiedchen *et al.*, 2018)。昆虫方面的研究表明蟑螂 *Periplaneta americana* 和果蝇 *Drosophila melanogaster* 在高压静电场的影响下,其运动能力发生改变(Jackson *et al.*, 2011; Newland *et al.*, 2015); 蜜蜂 *Apis mellifera*、竹节虫 *Carausius morosus* 和黄蜂 *Vespula vulgaris* 在静电场环境下其耗氧量和取食量均有所增加(Altmann, 1974); 蚕卵 *Bombyx mori* 早期经高压静电处理后蚕卵孵化期延长,孵化整齐度提高,蚕蛹重量增加(巨云为等, 2010)。

麦长管蚜 *Sitobion avenae* (Fabricius) 是麦类作物上的重要害虫,在农业生产研究中具有重要意义;且具有 R 对策者的显著特点,能较快的对环境变化做出反应,多以无翅孤雌繁殖方式为主,是研究环境胁迫下种群遗传进化的首选实验材料。本团队前期首先从在生态学领域入手,研究表明高压静电处理小麦种子或麦长管蚜都能够间接或直接的影响麦长管蚜生长发育、繁殖力、存活率及种群动态增长(李广雨等, 2016; Luo *et al.*, 2016)。对昆虫个体来说,高压静电场的变化形同一种环境胁迫因子,势必会导致生物体内活性氧(ROS)的产生(李达圣等, 2001; 贺曾等, 2010)。而超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)正是生物体内关键的抗氧化酶(Felton and Summers, 1995; Sies, 1995),且酶活力以及基因表达水平的变化不仅反映出生物体受损伤的程度,也体现出生物体对环境胁迫的防御机制(Henkle-Dührsen and Kampkotter, 2001; 郭洪亮等, 2005; 章轶锋等,

2008)。曹祝等曾对经高压静电处理后的麦长管蚜的抗氧化酶(SOD、POD、CAT)进行活性测定,结果发现其活性变化受高压静电影响显著(曹祝等, 2016)。叶家明等从分子水平上研究高压静电的生物学效应,发现高压静电能够引起染色体畸变(叶家明等, 1985),因此本研究推想麦长管蚜受到高压静电胁迫后是否会影响其抗氧化酶基因表达水平上的变化,以及麦长管蚜随世代的增加是否会在基因水平上对高压静电场环境产生防御能力。

基因转录调控水平的变化可作为研究遗传进化的有力机制和证据(Daborn *et al.*, 2002; Nicolas *et al.*, 2005)。为了探究这一科学问题,本研究测定了受高压静电胁迫后多世代麦长管蚜 4 种抗氧化酶基因(CuZnSOD、MnSOD、CAT、POD)转录水平的变化,并通过测定高压静电胁迫后各世代麦长管蚜体重增长率的变化加以佐证,以期探究麦长管蚜对静电胁迫的防御机制和研究昆虫生态适应及遗传进化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试虫源:将田间(37°14' N, 108°04' E)采集而来的 1 头无翅孤雌麦长管蚜,饲养在寄主小麦上无性繁殖 3~4 代,获得单克隆种群。饲养条件如下:温度 20 ± 0.5℃;相对湿度 60% ± 10%;光周期 16 L:8 D、光强 3 000 lx(孔艳艳, 2019)。

供试小麦:品种为矮抗 58,由农学院小麦遗传育种实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 高压静电场处理

本研究团队前期利用不同剂量高压静电对麦长管蚜进行生长发育、种群参数及抗氧化酶活性等研究,各项指标研究中每个处理均测定 60 头蚜虫,结果证明 4 kv/cm 强度的高压静电场下处理 20 min (4 kv/cm-20 min), 5 kv/cm 强度的高压静电场下处理 40 min (5 kv/cm-40 min) 对麦长管蚜

生理指标影响最大 (李广雨等, 2016; 曹祝等, 2016; He *et al.*, 2016), 因此本研究选取这两个不同的高压静电处理剂量进行进一步分析。选取籽粒饱满、大小一致的小麦种子和出生 12 h 内的若蚜, 利用高压静电发生器 (BM201) 进行 4 kv/cm-20 min, 5 kv/cm-40 min 两种剂量高压静电场的处理, 将未利用高压静电发生器处理的小麦种子和麦长管蚜作为对照研究。

1.2.2 高压静电处理后的小麦培养和蚜虫饲养

经不同处理后的小麦种子分别种植在 14.8 cm × 12.2 cm × 9 cm 的塑料花盆中, 以营养土为基质, 生长条件同 1.1。依据小麦生长需求定量浇水, 麦苗长至 14 日龄备用。按 1.2.1 中方法处理后的若蚜与小麦幼苗按不同处理剂量对应接种, 每个世代进行同样处理, 至第 40 代。

1.2.3 麦长管蚜相对日均体重增长率 (MRGR) 的测定

当高压静电处理至第 5 代、10 代、20 代、

27 代、33 代、39 代时, 根据胡想顺等 (2004) 方法进行相对日均体重增长率的测定, 用超微量天平 (METTLER-TOLEDO XS3DU) 进行称重, 每个处理剂量测定 60 头蚜虫。MRGR 计算公式为:

$$MRGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / DT$$

1.2.4 麦长管蚜 4 种抗氧化酶基因的引物设计

利用 NCBI 搜索豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、桃蚜 *Myzus persicae*、高粱蚜 *Melanaphis sacchari*、柑橘木虱 *Diaphorina citri* 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的 *CuZnSOD* 基因和 *MnSOD* 基因, 比对出氨基酸保守区域, 利用 CODEHOP 在线软件 (<http://blocks.fhcre.org/codehop.html>) 设计简并引物 (黄菁等, 2002); 麦长管蚜的 *CAT* 和 *POD* 基因片段扩增引物参考 Deng *et al.* (2014, 2016), 所设计引物如表 1 所示。

1.2.5 RNA 提取、RT-PCR 扩增及基因克隆

采用 Trizol 试剂法 (TIANGEN, 北京) 提取总 RNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence

引物应用 Application of primers	目标基因 Target gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')
PCR 引物 PCR primers	<i>CuZnSOD</i>	F: TCCACGAATTTCGGTGACaayaacnaaygg
		R: ACAGTTCGTGACCACCTTTAccnarrtertc
	<i>MnSOD</i>	F: AAATTCAACGGTGGTGGTcayathaayca
		R: CGTTTTTGTATTGCAGGTAGTAGgcertgytccca
	<i>CAT</i>	F: AGTGGWTCWGCYGATACYG
		R: TCMGGRSWWGGYTTCRATWCC
qPCR 引物 qPCR primers	<i>POD</i>	F: CATTGATTGGTAACGTTGATGG
		R: CAGCAATAACACAACCTCCAGT
	<i>CuZnSOD</i>	F: GAGCTCTGGTCCACATTTCA
		R: TGAGAGGTCCCGTAAGCGATA
	<i>MnSOD</i>	F: GGGATACCCTTACACCTCATTCCG
		R: CAACCCCATCCTGAACCTTGT
	<i>CAT</i>	F: AGAGACCCAAGAGGTTTTGCT
		R: TGA CTCAGGACGAAGAGTCAA
	<i>POD</i>	F: TCCCGCCCTACACTAAAAT
		R: TCAACCGATGAATAGAAAT
	<i>RPL7</i>	F: CCGAAAAGCTGTCATAATGAAGACC
		R: GGTGAAACCTTGTCTACTGTTACATCTTG

计检测 RNA 质量和浓度。然后按照反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (RR047A)) 说明书合成 cDNA 第一链。

以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系 (20 μL): 2 × SINGKE Master Mix 10 μL、上游/下游引物各 1 μL、cDNA 模板 2 μL, ddH₂O 6 μL。反应程序如下:

CuZnSOD: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 64 ~ 54℃ 45 s (每循环 2 次退火温度降低 2℃), 72℃ 1 min, 10 个循环; 94℃ 30 s, 54℃ 45 s, 72℃ 1 min, 40 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。

MnSOD: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 66 ~ 60℃ 45 s (每循环 1 次温度降低 2℃), 72℃ 1 min, 4 个循环; 94℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 40 个循环; 72℃, 10 min; 4℃ 保存。

CAT 和 *POD*: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 65 ~ 55℃ 45 s (每循环 1 次温度降低 1℃), 72℃ 1 min, 10 个循环; 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 40 个循环; 72℃, 10 min; 4℃ 保存。

2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测, 采用胶回收试剂盒 (TIANGEN, 北京) 纯化回收 DNA, 回收产物连接到 pMD™ 19-T 载体上, 转化至 DH5α 大肠杆菌感受态细胞。蓝白斑法筛选阳性克隆, 每个基因选择不少于 3 个阳性克隆送至天润奥科生物科技有限公司进行测序。

1.2.6 荧光定量 PCR

分别取 1.2.2 中处理至第 4 代、11 代、21 代、31 代、40 代的麦长管蚜 3 日龄成虫各 20 头, 按 1.2.5 中方法提取总 RNA, 用去除植物基因组 DNA 的反转录试剂盒 (TAKARA, RR047A) 合成 cDNA, 每个处理设置 3 个生物学重复。根据 1.2.5 中获得的基因片段设计荧光定量 PCR 引物 (表 1)。选取核糖体蛋白 L7 (*RPL7*) 基因作为内参基因 (Deng *et al.*, 2016), 使用 ABI QuantStudio 7 flex 实时定量 PCR 仪, 按照相对实时定量 TB Green 嵌合荧光法 (TAKARA, 大连) 说明书进行基因表达量测定。反应体系 (20 μL): 2 × TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 μL、上下游引物 (10 μM) 各 1 μL、cDNA 模板 2 μL, ROX Reference Dye II (50 ×) 0.4 μL, ddH₂O 5.6 μL。反应程序: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 54℃

35 s (4 个基因均为 54℃), 40 个循环; 溶解曲线阶段为: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算基因的相对表达量 (Deng, 2016)。计算公式为: 相对转录水平 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{样品}} - (Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{对照}}$$

1.3 数据分析

不同剂量强度的 HVEF 对麦长管蚜连续处理 40 代, 以高压静电的处理剂量和不同处理世代为因子, 利用 SPSS 21.0 软件对 4 种抗氧化酶基因相对表达水平进行双因素方差分析; 对同一世代不同剂量下和同一剂量不同世代间 4 种抗氧化酶基因的相对表达量数据和 MRGR 数据进行单因素方差分析。不同处理间采用 Student-Newman-Keuls (SNK) 法进行多重比较, 显著性差异水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 麦长管蚜相对日均体重增长率的变化

高压静电处理条件下麦长管蚜的相对日均体重增长率随世代的增加呈现先升高后降低的趋势, 在第 5 代和 39 代时增长率低于对照组, 其余世代下均高于对照组, 且在第 20 代和第 33 代与对照组差异显著。在第 39 代 4 kv/cm-20 min 处理剂量的高压静电使麦长管蚜的增长率抑制作用更明显 (图 1)。

2.2 麦长管蚜四种抗氧化酶基因的扩增结果及序列分析

简并引物 (*CuZnSOD*-F/R, *MnSOD*-F/R) 扩增得到 261 bp 的 *CuZnSOD* 和 319 bp 的 *MnSOD* 的特异性条带, 与目标条带大小相符 (图 2)。经测序得到这两个基因的核苷酸序列, 并推导出其氨基酸序列, Blast 比对发现克隆片段与 Genbank 中豌豆蚜该基因的同源性高达 99% 以上, 证明扩增得到麦长管蚜的 *CuZnSOD* 和 *MnSOD* 基因的部分序列, 可用于后续基因相对表达量的检测。

2.3 抗氧化酶基因相对表达水平

2.3.1 不同剂量 HVEF 辐射下麦长管蚜各世代 *CuZnSOD* 基因的表达模式

不同 HVEF 剂量和不同世代下麦长管蚜 *CuZnSOD* 基因相对表达量存在差异 (图 3)。4 kv/cm-20 min 辐射剂量下, *CuZnSOD* 基因的表

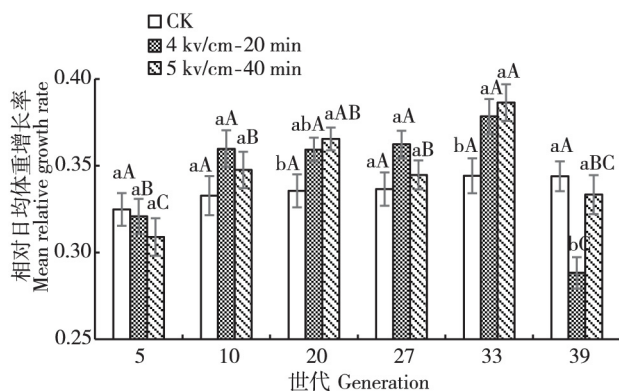


图1 不同剂量 HVEF 辐射对各世代麦长管蚜 MRGR 参数变化

Fig. 1 MRGR of *Sitobion avenae* at two HVEF treatment levels in succeeding generations

注: 同一世代不同处理间差异显著性用小写字母表示, 同一处理不同世代间差异显著性用大写字母表示 ($P < 0.05$)。下同。Note: The values were presented as means $\pm$ SE, lower letters a, b, c indicated the significant difference in different treatments, while upper letters A, B, C indicated the significant difference in different generations ($\alpha = 0.05$, SNK test). The same below.

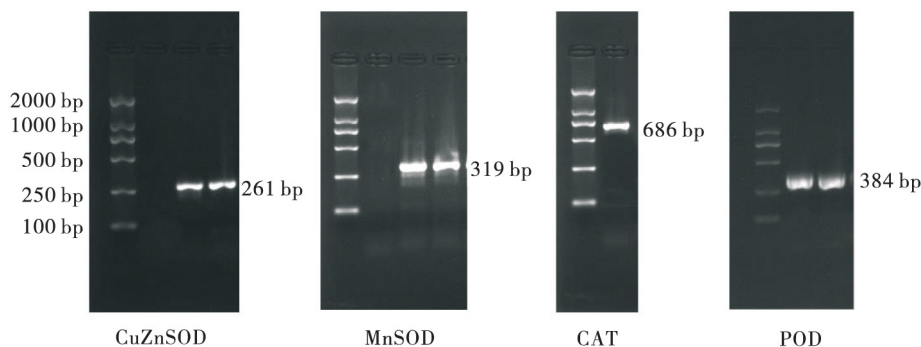


图2 麦长管蚜 4 种抗氧化酶基因 PCR 产物的电泳结果

Fig. 2 Result of PCR amplification of four antioxidant enzyme genes from *Sitobion avenae*

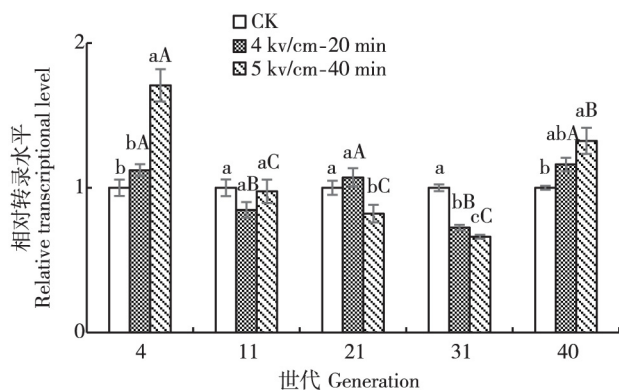


图3 不同剂量 HVEF 辐射后各代麦长管蚜 *CuZnSOD* 基因的相对转录水平

Fig. 3 Relative expression of *CuZnSOD* gene of *Sitobion avenae* at different generations exposed to HVEF

达量在第 31 代下调到最低值, 而在 40 代时显著上调。随着世代的增加, 5 kv/cm-40 min 剂量下麦长管蚜 *CuZnSOD* 基因表达总体呈反抛物线型。在第 4 代和 40 代, 与对照组相比, 5 kv/cm-40 min 剂量下麦长管蚜 *CuZnSOD* 基因的表达显著上调; 而在第 11~31 代基因表达呈下调模式。同一世代不同处理间相比, 在 21 代和 31 代, 5 kv/cm-40 min 剂量下 *CuZnSOD* 基因表达显著低于对照组和 4 kv/cm-20 min 处理组。同样在第 31 代, 其表达量达到最低点, 而在 40 代又显著上调。推测第 31 代至 40 代是麦长管蚜受高压静电辐射后产生变化的关键世代。

2.3.2 不同剂量 HVEF 辐射下麦长管蚜各世代 *MnSOD* 基因的表达模式

从不同世代分析来看, 4 kv/cm-20 min 剂量的高压静电处理至第 40 代时, *MnSOD* 表达开始变化, 呈显著上调模式 (图 4)。5 kv/cm-40 min 剂量的高压静电胁迫后, *MnSOD* 基因表达模式类似于 *CuZnSOD* 基因表达模式即两端高、中间低趋势, 即在第 4 代和第 40 代时麦长管蚜 *MnSOD* 基因

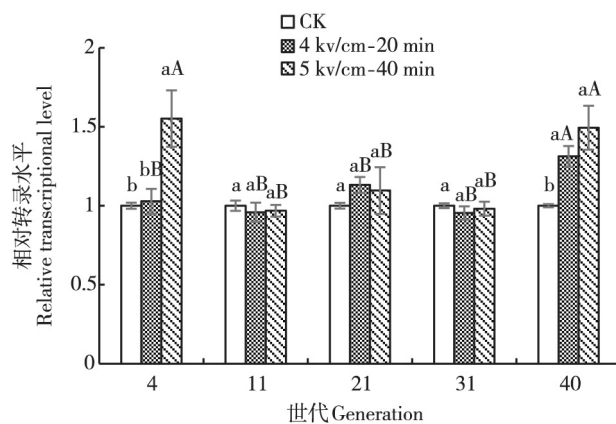


图4 不同剂量 HVEF 辐射后各代麦长管蚜 *MnSOD* 基因的相对转录水平

Fig. 4 Relative expression of *MnSOD* gene of *Sitobion avenae* at different generations exposed to HVEF

表达显著上调; 中间世代中 *MnSOD* 基因表达变化不显著、与对照也无差异。 *MnSOD* 基因与 *CuZnSOD* 基因表达的差异可能是两者协同发挥作用。

2.3.3 不同剂量 HVEF 辐射下麦长管蚜各世代 *CAT* 基因的表达模式

经不同剂量高压静电处理后各世代麦长管蚜 *CAT* 基因表达也表现出差异 (图 5), 高压静电处理至第 4 代时, 麦长管蚜 *CAT* 基因的表达上调, 但与对照组差异不显著。第 4 代以后, 两处理剂量下的麦长管蚜 *CAT* 基因的表达量均呈下调模式, 连续胁迫至第 11、31、40 代其表达量下调水平与对照相比差异显著。前人对 *CAT* 酶活性的测定得到相似的结果, 经高压静电胁迫后, 各代麦长管蚜的 *CAT* 酶活性均受到抑制 (Luo *et al.*, 2019)。推测这有可能是因为静电胁迫条件下阻碍了 *CAT* 清除蚜虫受静电胁迫直接产生的大量 H_2O_2 , 也可能阻碍 *CAT* 清除来自 *SOD* 作用后产生的 H_2O_2 , 具体机制有待于进一步证明。

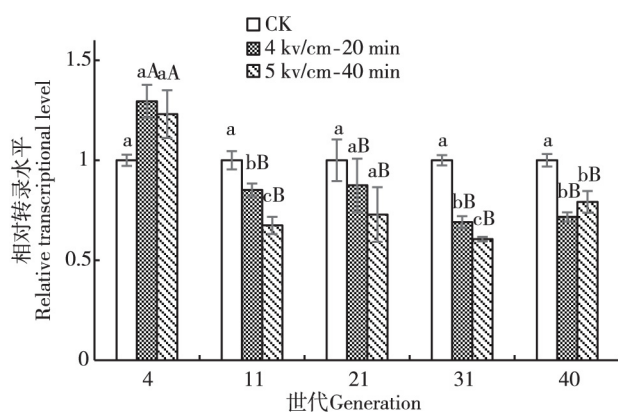


图 5 不同剂量 HVEF 辐射后各代麦长管蚜 *CAT* 基因的相对转录水平

Fig. 5 Relative expression of *CAT* gene of *Sitobion avenae* at different generations exposed to HVEF

2.3.4 不同剂量 HVEF 辐射下麦长管蚜各世代 *POD* 基因的表达模式

对不同处理剂量下各世代麦长管蚜 *POD* 基因表达量进行测定, 结果表明 (图 6), 随世代的增加, 高压静电辐射下麦长管蚜 *POD* 基因的表达也表现出反抛物线趋势, 在第 4 代和第 40 代, 两种处理剂量下麦长管蚜 *POD* 基因表达均显著上调; 而第 11 代和 31 代时, *POD* 基因表达显著下调。不同处理间相比, 5 kv/cm-40 min 处理组在第 4 代达到最高值, 说明短期内麦长管蚜对高剂量 HVEF

辐射更敏感。而 4 kv/cm-20 min 处理组在第 40 代表达量达到最高值, 说明该强度下高压静电累积作用能对麦长管蚜 *POD* 基因产生严重影响。

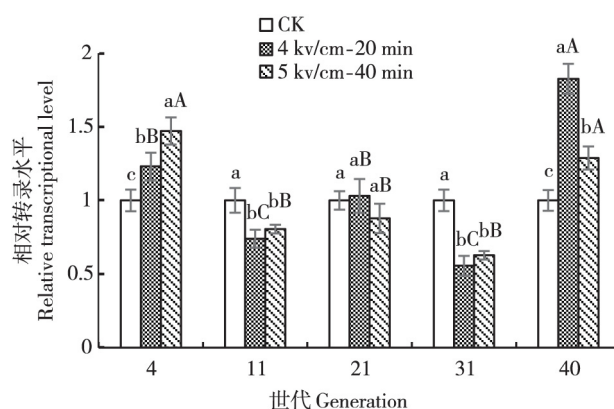


图 6 不同剂量 HVEF 辐射后各代麦长管蚜 *POD* 基因的相对转录水平

Fig. 6 Relative expression of *POD* gene of *Sitobion avenae* at different generations exposed to HVEF

2.3.5 不同剂量 HVEF 和不同处理世代对基因表达水平的主体间效应检验

将不同剂量 HVEF (4 kv/cm-20 min, 5 kv/cm-40 min) 和处理世代 (第 4, 11, 21, 31, 40 代) 作为两种影响因子, 对其进行双因素方差分析 (如表 2)。主体间效应检验结果表明, HVEF 处理剂量、不同世代两种因素对麦长管蚜四种抗氧化酶基因表达的影响具有交互作用。根据各偏差平方和占总偏差平方和的比例表明, 世代变化对麦长管蚜抗氧化酶基因的影响更显著, 说明受高压静电处理后麦长管蚜在随世代变化过程中自身机制也发生着改变, 这对后代麦长管蚜应对高压静电胁迫能力起着关键作用。

3 结论与讨论

本研究结果表明, 不同世代麦长管蚜对高压静电胁迫具有不同的应对能力, 且具有一定的规律性。主要表现在以下两点: 麦长管蚜受到不同剂量高压静电长期胁迫后体内 4 种抗氧化酶基因表达量的发生改变: *CuZnSOD*、*MnSOD*、*POD* 3 种抗氧化酶基因均在第 4 代和第 40 代上调, 第 11~31 代基因表达不显著或呈下调模式; 从生长发育方面来看, 其相对日均体重增长率呈现先增高后降低的趋势, 在第 5 代和第 39 代低于对照组, 中间世代高于对照组。从宏观体重增长变化以及

表 2 不同剂量 HVEF 与处理世代双因素对麦长管蚜四种抗氧化酶基因表达量的主体间效应检验
Table 2 Tests of between-subject effect on expression levels of four antioxidant enzyme gene in *Sitobion avenae* under the dual factor of different intensities of HVEF and different generations

因变量 Dependent variable	源 Source	偏差平方和 Sum of squared deviations	自由度 df	F	p
CuZnSOD	不同世代 Generation	2. 617	4	21. 903	0. 000
	不同强度 Intensity	0. 228	2	3. 813	0. 026
	世代×强度 Generation × Intensity	2. 477	8	10. 366	0. 000
	误差 Error	2. 240	75	—	—
	总计 Total	102. 622	90	—	—
MnSOD	不同世代 Generation	1. 225	4	8. 069	0. 000
	不同强度 Intensity	0. 734	2	9. 675	0. 000
	世代×强度 Generation × Intensity	1. 24	8	4. 085	0. 000
	误差 Error	2. 845	75	—	—
	总计 Total	114. 628	90	—	—
CAT	不同世代 Generation	1. 843	4	17. 755	0. 000
	不同强度 Intensity	0. 569	2	10. 964	0. 000
	世代×强度 Generation × Intensity	1. 035	8	4. 987	0. 000
	误差 Error	1. 946	75	—	—
	总计 Total	77. 865	90	—	—
POD	不同世代 Generation	4. 052	4	25. 943	0. 000
	不同强度 Intensity	0. 005	2	0. 058	0. 943
	世代×强度 Generation × Intensity	2. 461	8	7. 877	0. 000
	误差 Error	2. 929	75	—	—
	总计 Total	101. 255	90	—	—

微观基因表达水平上探究出高压静电胁迫后麦长管蚜在世代进化中的变化规律，为进一步探究其防御机制和对生态胁迫的遗传进化研究提供参考。

正常情况下，SOD、POD、CAT 基因的表达生物体生长发育和寿命是至关重要的，研究表明将 POD 和 CAT 酶基因沉默后，对麦长管蚜的生长发育均呈现抑制作用（Deng and Zhao, 2014; Deng et al., 2016）。然而，大量研究也表明抗氧化酶基因能被许多环境胁迫因子诱导，例如紫外线辐射、重金属、农药、高温等（Yong et al., 2012; 郑玉涛, 2015; Ali et al., 2017），因此抗氧化酶的过量表达印证了昆虫此时正受到不利因素的胁迫。本研究中，经短期高压静电胁迫后，在第 4 代 4 种抗氧化酶基因均呈现上调模式；第 5 代对中麦长管蚜 MRGR 相对也较低，这两种指标均说明麦长管

蚜在第 4 ~ 5 代中受到高压静电胁迫比较严重。Luo et al.（2019）研究表明，4 kv/cm-20 min 处理剂量下 SOD 和 POD 酶活性在第 2 ~ 6 代间均呈升高趋势，也印证了这一观点。推测可能是由于高压静电场作用初期，生长环境条件的突然改变使蚜虫体内产生了大量 O⁻²，SOD 作为保护酶，受诱导后大量表达以消除体内的超氧自由基，POD 也相应的发挥作用，一方面清除蚜虫受静电胁迫直接产生的大量 H₂O₂，另一方面清除来自 SOD 作用后产生的 H₂O₂（Cross and Jones, 1991; 李毅平和龚和, 1998; Mates, 2000）。

随着世代的延长，CuZnSOD 基因及 CAT 基因的表达开始下调。姚立虎等（2009）在研究紫外线辐射胁迫时发现，短时间紫外线辐射下，柞蚕 *Antheraea pernyi* 体内 CuZnSOD 基因表达上调；而

随辐射时间的延长, *CuZnSOD* 基因的表达呈下调模式, 这与本研究结果相类似。说明前期麦长管蚜通过抗氧化酶基因表达及酶活性的升高, 清除了高压静电激发氧化胁迫的毒害作用。除此之外, 昆虫还具有复杂的生理代谢机制, 包括与各类代谢途径、线粒体内能量传递链、细胞结构等其相关的酶(解毒酶、保护酶等)、基因变异等的变化(Nguyen, 2009)。面对环境胁迫, 生物体也会激发其他途径进行调节, 极端情况下基因也会发生异位、突变等不断进化来适应新环境。因此麦长管蚜经过一定阶段的适应, 在第 10 代之后, 其抗氧化酶基因表达水平恢复正常, 相对日均体重增长率也有所升高。

高压静电场的生物效应具有累积性的特点。当麦长管蚜经高压静电持续处理至 40 代时, 静电场累积胁迫超过麦长管蚜的承受范围, 因此导致麦长管蚜在此阶段生长发育受到严重影响, 相对日均体重增长率显著降低, 激发抗氧化酶基因的表达来应对环境胁迫。本研究中通过不同世代与不同剂量高压静电对麦长管蚜基因表达水平的双因素分析结果表明, 世代变化是抗氧化酶基因表达的主要影响因素, 证明麦长管蚜随世代变化对高压静电具有抵御和适应的生理机制, 其中抗氧化酶在其中发挥一定作用。

本研究进一步表明高压静电场具有剂量性等生物学效应的特点, 不同强度高压静电处理下对麦长管蚜产生的胁迫作用不同(张俐等, 2000; 那日和冯璐, 2003; 陈建中等, 2015)。本研究对麦长管蚜在应对静电胁迫时 4 种抗氧化酶基因表达规律研究发现, 5 kv/cm-40 min 处理下, 麦长管蚜在短世代内呈现频繁的上调和下调模式, 可能是由于该剂量强度胁迫下蚜虫对于 5 kv/cm-40 min 剂量的高压静电处理防御及应对能力更强。而在 4 kv/cm-20 min 处理剂量下, 麦长管蚜相对日均体重增长率在 40 代达到最低, 且该剂量下, *SOD* 和 *POD* 基因的表达水平仅在 39 代显著增高, 说明 4 kv/cm-20 min 处理剂量有较强的世代累积毒性。曾有研究表明高压静电处理麦种使幼苗中氨基酸、糖类等营养物质成分含量增高(王淑慧等, 1990), 推测 5 kv/cm-40 min 剂量下寄主植物中营养成分的变化也是导致该强度下麦长管蚜防御及应对能力更强的原因之一, 将通过麦长管蚜取食行为研究进一步验证。

高压静电胁迫下, 随世代延长麦长管蚜抗氧

化酶基因表达存在差异, 证明麦长管蚜对高压静电场胁迫有一定的调整适应和再防御的规律。本实验初步从抗氧化酶基因转录水平来探究高压静电长期辐射下麦长管蚜随世代的变化规律及应对表现, 那么胁迫条件下麦长管蚜势必有更多的生理途径相互作用参与应对环境胁迫, 以及蚜虫是否通过遗传变异来适应新环境将在以后的研究中进一步验证。

参考文献 (References)

- Ali A, Rashid MA, Huang QY, *et al.* Influence of UV-A radiation on oxidative stress and antioxidant enzymes in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24 (9): 1-7.
- Altmann G. Oxygen and biochemical changes following ELF exposure. In: Altmann G, ed. *ELF and VLF Electromagnetic Field Effects* [C]. New York: Plenum Press, 1974, 227-241.
- Cao Z, Li GY, He J, *et al.* Effects of high voltage electrostatic fields on protective enzyme activity in wheat plants and on the population dynamics of *Sitobion avenae* Fabricius (Hemiptera: Aphididae) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36 (4): 1001-1009. 曹祝, 李广雨, 赫娟, 等. 高压静电场对小麦叶片保护酶系统及麦长管蚜种群动态的影响 [J]. *生态学报*, 2016, 36 (4): 1001-1009.
- Chen JZ, Hu JF, Du HL, *et al.* Biological effects of treatment with high-voltage electrostatic field on tomato [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2015, 54 (1): 7-10. 陈建中, 胡建芳, 杜慧玲, 等. 番茄高压静电场处理的生物效应研究 [J]. *湖北农业科学*, 2015, 54 (1): 7-10.
- Cross AR, Jones OTG. Enzymic mechanisms of superoxide production [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Bioenergetics*, 1991, 1057 (3): 281-298.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, *et al.* A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila* [J]. *Science*, 2002, 297 (5590): 2253-2256.
- Deng F, Zhao Z. Influence of catalase gene silencing on the survivability of *Sitobion avenae* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2014, 86 (1): 46-57.
- Deng F, He Q, Zhao Z. Suppressing a peroxidase gene reduces survival in the wheat aphids *Sitobion avenae* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2016, 93 (2): 86-95.
- Felton GW, Summers CB. Antioxidant systems in insects [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1995, 2 (29): 187-197.
- Guo HL, Zhao HW, Xu ZF, *et al.* Manganese superoxide dismutase gene transfection of mouse small intestinal epithelial cells protects them from radiation injury [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2005, 27 (11): 672-675. 郭洪亮, 赵红伟, 徐忠法, 等. 锰超氧化物歧化酶基因转染小鼠小肠上皮细胞的放射损伤保护作用 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27 (11): 672-675.
- He J, Cao Z, Yang J, *et al.* Effects of static electric fields on growth

- and development of wheat aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) through multiple generations [J]. *Journal of Bioelectricity*, 2016, 35 (1): 1–7.
- He Z, Du LB, Jiang YG, *et al.* Damages to PS II component proteins by endogenous superoxide anion radicals in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2010, 26 (4): 301–308. [贺曾, 杜立波, 姜玉岗, 等. 内源性超氧阴离子自由基介导的莱茵衣藻光系统 II 蛋白组分损伤 [J]. *生物物理学报*, 2010, 26 (4): 301–308]
- Henkle – Duhrsen K, Kampkotter A. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2001, 114 (2): 129–142.
- Huang J, Wang SL, Qiao CL. Automated programming of degenerate primers and the cloning of the diamondback esterase gene [J]. *Entomological Knowledge*, 2002, 39 (6): 458–461. [黄菁, 王少丽, 乔传令. 程序化设计简并引物与克隆小菜蛾酯酶基因 [J]. *昆虫知识*, 2002, 39 (6): 458–461]
- Hu XS, Zhao HY, Heimbach U, *et al.* Study on cereal aphid resistance on three winter wheat cultivars introduced into China [J]. *Acta Botanica Boreali – Occidentalia Sinica*, 2004, 24 (7): 1221–1226. [胡想顺, 赵惠燕, Heimbach U, 等. 3 个新引进小麦品种对麦长管蚜抗性的初步研究 [J]. *西北植物学报*, 2004, 24 (7): 1221–1226]
- Jackson CW, Hunt E, Sharkh S, *et al.* Static electric fields modify the locomotory behaviour of cockroaches [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2011, 214 (12): 2020–2026.
- Ju YW, Xu ZHX, Wang JB, *et al.* Effect of high voltage electrostatic field on biological characters of silkworm eggs [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010, (1): 251–252, 292. [巨云为, 许忠祥, 王建斌, 等. 高压静电场处理家蚕卵对家蚕生物学性状的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2010, (1): 251–252, 292]
- Kong YY. The Effects of Long Term High Voltage Electrostatic Fields Stress on the Feeding Behavior and Physiological and Biochemical Characteristics of the *Sitobion avenae* (Fabricius) [D]. Shanxi: Northwest A & F University, 2019. [孔艳艳. 高压静电场长期胁迫对麦长管蚜取食行为及生理生化影响的研究 [D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2019]
- Li DS, Kanehisa M, Tatsuya T, *et al.* Protective effects of reactive oxygen species against arsenic-induced DNA damage in human cells [J]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2001, 20 (4): 252–254. [李达圣, Kanehisa M, Tatsuya T, 等. 氧自由基清除剂对砷所致细胞 DNA 损伤的保护作用 [J]. *中华地方病学杂志*, 2001, 20 (4): 252–254]
- Li GY, Gao R, Cao Z, *et al.* Effect of high-voltage electrostatic field (HVEF) on the growth and fecundity of *Sitobion avenae* Fabricius (Hemiptera: Aphididae) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36 (13): 3987–3994. [李广雨, 高瑞, 赫娟, 等. 高压静电场胁迫对麦长管蚜种群生长发育与繁殖的影响 [J]. *生态学报*, 2016, 36 (13): 3987–3994]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402.
- Li YP, Gong H. The research progress of antioxidant systems in insects [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 1998, 10 (5): 240–243. [李毅平, 龚和. 昆虫体内抗氧化系统研究进展 [J]. *生命科学*, 1998, 10 (5): 240–243]
- Luo K, Luo C, Li GY, *et al.* High-voltage electrostatic field-induced oxidative stress: Characterization of the physiological effects in *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) across multiple generations [J]. *Bioelectromagnetics*, 2019, 40 (1): 52–61.
- Luo K, Cao Z, Gao R, *et al.* Direct exposure of wheat seeds to high-voltage electrostatic fields adversely affects the performance of *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2016, 109 (6): 2418.
- Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology [J]. *Toxicology*, 2000, 153 (1): 83–104.
- Murr LE. The biophysics of plant growth in a reversed electrostatic field: A comparison with conventional electrostatic and electrokinetic field growth responses [J]. *International Journal of Biometeorology*, 1966, 10 (2): 135–146.
- Na R, Feng L. Mechanism of the biological effects of electrostatics [J]. *Physics*, 2003, 32 (2): 87–93. [那日, 冯璐. 我国静电生物学效应机理研究新进展 [J]. *物理*, 2003, 32 (2): 87–93]
- Newland PL, Al Ghamdi MS, Sharkh S, *et al.* Exposure to static electric fields leads to changes in biogenic amine levels in the brains of *Drosophila* [J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015, 282 (1812): 20151198.
- Nguyen TTA, Michaud D, Cloutier C. A proteomic analysis of the aphid *Macrosiphum euphorbiae* under heat and radiation stress [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39 (1): 20–30.
- Nicolas G, Benjamin P, Wittkopp PJ, *et al.* Chance caught on the wing: Cis-regulatory evolution and the origin of pigment patterns in *Drosophila* [J]. *Nature*, 2005, 433 (7025): 481–487.
- Schmiedchen K, Petri A, Driessen S, *et al.* Systematic review of biological effects of exposure to static electric fields. Part II: Invertebrates and plants [J]. *Environmental Research*, 2018, 160: 60–76.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense: Relations to oxidative stress [J]. 1995.
- Wang SH, Li XD, Song CX. Wheat seeds treated by high-voltage electrostatic field effects on the seedling growth and chemical composition [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1991, 18 (5): 392–393. [王淑惠, 黎先栋, 宋长铤. 高压静电场处理小麦种子对幼苗生长和有关化学成分的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18 (5): 392–393]
- Wu CY, Zhang L, Zheng SM. Biological effect mechanism and application of high voltage electrostatic field on animal body [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2004, 25 (3): 7–9. [吴春艳, 张俐, 郑世民. 高压静电场对动物机体生物效应的影响机理及其应用 [J]. *动物医学进展*, 2004, 25 (3): 7–9]
- Yao LH, Zhu BJ, Liu JL, *et al.* Cloning and expression analysis of copper/zinc superoxide dismutase gene from *Antheraea pernyi* [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2009, 35 (3): 547–551. [姚立虎, 朱

- 保建, 刘朝良, 等. 柞蚕铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆与表达分析 [J]. 蚕业科学, 2009, 35 (3): 547–551]
- Ye JM, Gao TS, Zhou HL, *et al.* Effects of high-voltage electrostatic field on chromosome aberration in root tip cells of rye (*Secale cereale*) and broad bean (*Vicia faba*) [J]. *Journal of Northeast Normal University*, 1985, 8 (1): 61–66. [叶家明, 高天舜, 周好乐, 等. 高压静电场对黑麦和蚕豆根尖细胞染色体畸变的作用 [J]. 东北师大学报自然科学版, 1985, 8 (1): 61–66]
- Yong W, Li JW, Zhi HZ, *et al.* The molecular characterization of antioxidant enzyme genes in *Helicoverpa armigera* adults and their involvement in response to ultraviolet-A stress [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58 (9): 1250–1258.
- Zhang YF, Tang SH, Qin WL, *et al.* The research progress on Cu-Zn superoxide dismutase [J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2008, 35 (1): 33–35. [章轶锋, 唐善虎, 秦文玲, 等. 铜锌超氧化物歧化酶的研究进展 [J]. 四川畜牧兽医杂志, 2008, 35 (1): 33–35]
- Zhang L, Shen XY, Yang F. The research progress on biological effect of high voltage electrostatic field [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2000, 31 (3): 307–312. [张俐, 申勋业, 杨方. 高压静电场对生物效应影响的研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2000, 31 (3): 307–312]
- Zhao RP, Hao JX, Xue J, *et al.* Effect of high-voltage electrostatic field pretreatment on the antioxidant system in stored green mature tomatoes [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91 (9): 1680–1686.
- Zheng YT. Effect of the High Temperature Stress on Antioxidant Enzyme Activity and Cloning and Expression of CAT Gene of *Frankliniella occidentalis* [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015. [郑玉涛, 高温胁迫对西花蓟马抗氧化酶活性的影响及 CAT 基因的克隆与表达 [D]. 扬州: 扬州大学, 2015]