

CO₂ 倍增和转 Bt 水稻对二化螟幼虫的生理影响^{*}

常晓娜¹ 韩 超¹ 肖能文² 李俊生² 陈法军^{1**}

(1. 南京农业大学植物保护学院 南京 210095; 2. 中国环境科学研究院环境科学研究所 北京 100012)

Impacts of elevated CO₂ on the larvae of stem borer *Chilo suppressalis* fed on transgenic Bt rice.
CHANG Xiao-Na¹, HAN Chao¹, XIAO Neng-Wen², LI Jun-Sheng², CHEN Fa-Jun^{1**} (1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Ecological Environment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract The effects of double-atmospheric CO₂ (750 vs. 375 μL/L) on the metabolic enzyme acetylcholinesterase (AChE) and the three protective enzymes, superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT), were investigated on stem borer *Chilo suppressalis* (Walker) larvae as these fed on transgenic Bt rice (cv. KMD expressing pure *Cry1Ab*) and nontransgenic rice (cv. XSD; i. e., the parental line) in open-top chambers. The results indicate that: (1) Increased CO₂ levels significantly reduced AChE activity in larvae feeding on both transgenic Bt rice or nontransgenic rice. (2) Elevated CO₂ and Bt rice both markedly enhanced the activities of POD and SOD. POD activity decreased sharply but SOD activity increased only initially. An obvious increase in CAT activity was observed initially but this declined after a period. (3) There were significant interactive effects between CO₂ level, rice variety and sampling time. It appears that *C. suppressalis* can alleviate some short-term adverse effects of elevated CO₂ and transgenic Bt rice through physiological regulation using metabolic and protective enzymes. However, this regulatory mechanism can be suppressed by environmental factors, which can thereby reduce population performance.

Key words double CO₂ level, *Chilo suppressalis*, transgenic Bt rice, metabolism enzymes, protective enzyme

摘 要 通过开顶式气室研究了 CO₂ 浓度倍增(750 vs. 375 μL/L)对取食转 Bt 水稻及其对照亲本秀水 11 的二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 幼虫体内代谢酶乙酰胆碱酯酶(AChE)和保护酶(超氧化物歧化酶 SOD、过氧化物酶 POD 和过氧化氢酶 CAT)活力的影响,以期明确该类害虫对大气 CO₂ 浓度升高及转 Bt 水稻的生理响应。研究表明:(1) AChE 受 CO₂ 浓度水平影响显著,与对照 CO₂ 处理相比,高 CO₂ 条件下该酶活力显著降低;(2) 高 CO₂ 水平及水稻中 Bt 毒素蛋白的存在均会导致二化螟幼虫体内 POD 活力显著降低, SOD 初期活力显著升高,但不能维持较长时间, CAT 活力表现为先升后降的特点;(3) 当受到水稻品种、CO₂ 浓度水平和取食时间的综合影响时,以上代谢酶和保护酶活力会发生显著变化。短时间内二化螟幼虫可通过体内以上生理代谢调节减缓受 CO₂ 浓度升高和水稻中 Bt 毒素蛋白的不利影响,但长时间环境胁迫下这种应对不利环境的响应机制将会失去作用,最终导致种群适合度的降低。

关键词 CO₂ 倍增, 二化螟, 转 Bt 水稻, 代谢酶, 保护酶

^{*} 资助项目:转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08012-005、2009ZX08012-005B、2009ZX08011-007B)、国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB126201)、公益性行业(农业)科研专项项目(200903051)和教育部博士点基金(20070307002)。

^{**} 通讯作者, E-mail: fajunchen@njau.edu.cn

收稿日期:2009-12-24,修回日期:2010-01-28

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 是一种钻蛀危害水稻的重要害虫,严重影响水稻生产。因其在水稻表面停留时间短,药物防治困难,所以利用转基因技术培育优良的水稻抗虫品种可作为防治二化螟的一种长期而有效的新途径。已有研究表明,转 Bt 水稻不仅可有效防治包括二化螟在内的多种鳞翅目害虫,还间接减轻了因施药对环境造成的污染^[1-3]。然而,生产中存在诸多因素影响转 Bt 水稻的抗虫效果。同时,二化螟的发生危害还受气候、食料、栽培制度和天敌等因素的综合影响^[4-6]。

目前,全球正面临着大气 CO₂ 浓度升高这一严重的环境问题。据报道,1700—1900 年,大气 CO₂ 浓度升高了近 10 μL/L,达到 290 μL/L;而 1900—1998 年,大气 CO₂ 浓度则升高了 77 μL/L,达到了 367 μL/L;而当前大气 CO₂ 浓度已达到了 375 μL/L 左右,并预计在 21 世纪 50 年代,CO₂ 浓度将加倍,即增加到 700 μL/L 左右^[7-9]。大气 CO₂ 浓度升高可有效提高水稻的光合作用和生产力^[10,11],同时导致组织内的含氮量减少,提高 C/N 比^[12,13],进而影响到以之为食的植食性害虫(包括二化螟)。此外,对转 Bt 水稻而言,外源 Bt 杀虫蛋白是组织内的氮素合成的,CO₂ 浓度升高直接导致水稻中 Bt 毒素表达量的显著降低^[14],进而会影响其对靶标抗虫性。可见,大气 CO₂ 浓度升高及转 Bt 抗虫水稻的种植也将加重对二化螟种群的影响,当然,这种综合性影响是复杂的。

本文通过开顶式 CO₂ 气室 (Open-top chamber; OTC) 方法,以转 Bt 抗虫水稻及其对照亲本水稻为寄主植物,研究当前大气 CO₂ 浓度 (375 μL/L) 及 CO₂ 浓度倍增 (750 μL/L) 情况下二化螟幼虫体内代谢酶和保护酶活力的变化情况,以明确 CO₂ 浓度升高这一全球气候变化背景下二化螟对转 Bt 抗虫水稻的生理调控及其生态响应,为更有效地防治二化螟和延长转 Bt 抗虫水稻的使用寿命提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 开顶式气室

试验于 2008 年 6 月—10 月在山东宁津大田 OTC (Open-top chamber) 试验基地进行。试验设置 2 个大气 CO₂ 浓度水平,即当前的 CO₂ 浓度 (约 375 μL/L) 和大气 CO₂ 浓度倍增 (约 750 μL/L),每个 CO₂ 浓度水平使用 3 个 OTC 设置。试验期间,全天 24 h 通气。开顶式气室 (OTC) 的物理结构和 CO₂ 浓度自动控制系统详见陈法军和戈峰^[15] 以及陈法军等^[16]。

1.2 供试材料

1.2.1 供试水稻 试验所用转 Bt 水稻为克螟稻 (KMD),其对照亲本为秀水 11 (XSD) (均由浙江大学原子能研究所提供)。2008 年 6 月 12 日浸种 48 h 后播种于塑料盆 (直径 = 35 cm,高 = 45 cm) 中,试验用土为壤土:干牛粪 = 8:2,每个 OTC 内随机放置每个水稻品种 30 盆,每盆种植 30 株水稻,分蘖期后每盆保留 60 株水稻。播种后 OTC 即开始通气,每周相同处理间气室内水稻轮换放置,以减少气室之间小气候差异对试验造成的实验误差。试验期间,不使用任何化肥和农药,整个生育期水稻浸水处理。开顶式气室顶部罩以 80 目纱网,以防止外面的昆虫侵入。

1.2.2 供试二化螟 试验所用二化螟种群为南京农业大学昆虫系多年饲养的实验室敏感品系,未接触转 Bt 水稻及 Bt 毒素。二化螟先接种于人工培养箱里秀水 11 的稻苗上,扩大种群以备试验用。人工气候箱的温度:白天为 (28 ± 1) °C;夜间为 (26 ± 1) °C;相对湿度为 60% ~ 70%,光周期为 L:D = 14:10;光照强度为 9 000 lx。水稻分蘖期,每个 OTC 内随机接种 KMD 和 XSD 各 10 盆,每盆接种 3 头饥饿 24 h 的二化螟 4 龄幼虫,每个水稻品种试验虫数为 3 头/盆 × 10 盆/OTC × 3OTCs = 90 头,4 个处理接种危害试验共计 360 头幼虫。待取食 12、30 h 后各收集一半虫量,分别 -20 °C 冷冻保存备用。

1.3 试验方法

每处理取冷冻保存备用的 10 头 4 龄幼虫,加入预冷的 pH 7.2,0.04 mol/L 的磷酸盐缓冲液 4 mL,冰浴匀浆,以 4 000 r/min 速度离心 10 min,取上清液为代谢酶酶源,各 3 次重复。

同时,每处理取冷冻保存备用的 20 头老龄若虫,加入 4 mL 预冷的 1% 聚乙烯吡咯烷酮 (pH7.0, 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液配制) 冰浴匀浆,以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液为保护酶酶源,各 3 次重复。代谢酶乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和 3 种保护酶超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 的活性测定参照相关试剂盒 (南京建成生物技术有限公司)。酶源蛋白含量测定参照 Bradford 的方法^[7]。以牛血清蛋白为标准蛋白制作标准曲线。

1.4 统计分析

用 SAS6.12 统计软件 (SAS Institute, USA, 1996) 来进行试验数据的统计分析。用三因子方差分析 (Three-way ANOVA) 来研究水稻品种和 CO₂ 浓度变化对二化螟体内解毒酶和代谢酶活力变化情况。处理组间差异显著性采用 LSD 检验 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 二化螟体内乙酰胆碱酯酶活性变化

表 1 CO₂ 浓度升高对接种危害转 Bt 水稻 (克螟稻) 及其亲本水稻 (秀水 11) 不同时间的二化螟幼虫相关酶活性的影响 (三因子方差分析, P 值)

作用因子	AChE	POD	SOD	CAT
CO ₂ 水平	<0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***	0.15
水稻品种	0.50	<0.0001 ***	0.0009 ***	0.28
接种时间	0.26	<0.0001 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***
CO ₂ 水平 × 水稻品种	0.19	<0.0001 ***	<0.0001 ***	0.55
CO ₂ 水平 × 接种时间	0.21	<0.0001 ***	0.032*	0.67
水稻品种 × 接种时间	0.056	<0.0001 ***	0.014*	0.0022 **
CO ₂ 水平 × 水稻品种 × 接种时间	0.0008 ***	<0.0001 ***	<0.0001 ***	0.0021 **

注:CO₂ 水平:750 μL/L vs 375 μL/L;水稻品种:克螟稻 vs 亲本秀水 11;接种时间:12 h vs 30 h; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.2 二化螟体内 POD 活性变化

三因子方差分析表明,CO₂ 浓度水平、水稻品种、接种危害时间及三者间的交互作用都显著影响二化螟幼虫体内 POD 活性 ($P < 0.001$; 表 1)。与对照 CO₂ 处理相比,高 CO₂ 处理下接种危害亲本水稻 12 h 和 30 h 后幼虫体内 POD 活力分别显著降低 30.1% 和 24.2% ($P < 0.05$),而取食转 Bt 水稻时其 POD 分别升高 4.4% ($P > 0.05$) 和 8.9% ($P < 0.05$)。此外,

CO₂ 浓度水平可极显著影响二化螟幼虫体内 AChE 活力 ($P < 0.001$);同时,CO₂ 水平、水稻品种和接种危害时间之间存在极显著的交互作用 ($P = 0.0008 < 0.001$;表 1)。与对照 CO₂ 处理相比,高 CO₂ 浓度可明显抑制二化螟幼虫体内 AChE 活性 (图 1);接种危害 12 h 和 30 h 后,高 CO₂ 处理下二化螟幼虫体内 AChE 活性分别比对照 CO₂ 处理降低 23.3% ($P < 0.05$) 和 3.6% (转 Bt 水稻),2.9% 和 13.9% ($P < 0.05$) (对照亲本处理)。此外,与亲本处理相比,高 CO₂ 处理下接种危害转 Bt 水稻 12 h 后二化螟幼虫体内 AChE 活力也显著降低 16.7% ($P < 0.05$;图 1A)。不同接种危害时间处理间,二化螟幼虫体内 AChE 活性仅在取食高浓度 CO₂ 下生长的转 Bt 水稻和对照亲本水稻时才表现显著性差异 ($P < 0.05$;图 1),12 h 处理 AChE 活性显著升高 15.2%,30 h 处理 AChE 活性显著降低 12.1%。

与亲本水稻处理相比,除了高 CO₂ 处理下接种危害转 Bt 水稻 30 h 后二化螟幼虫体内 POD 活性显著提高外 ($P < 0.05$;图 2B),其它情况下取食转 Bt 水稻可显著降低其 POD 活力 ($P < 0.05$;图 2)。不同接种危害时间处理间,二化螟幼虫取食转 Bt 水稻和对照亲本水稻后其 POD 均表现显著性差异 ($P < 0.05$;图 2)。对照 CO₂ 处理下,12 h 处理 POD 活性显著升高 41.3%,30 h 处理 POD 活性显著降低 9.6%,而

高 CO₂ 处理下,12 h 处理显著升高 47.5%,30 h 处理显著降低 2.0% ($P < 0.05$; 图 2)。

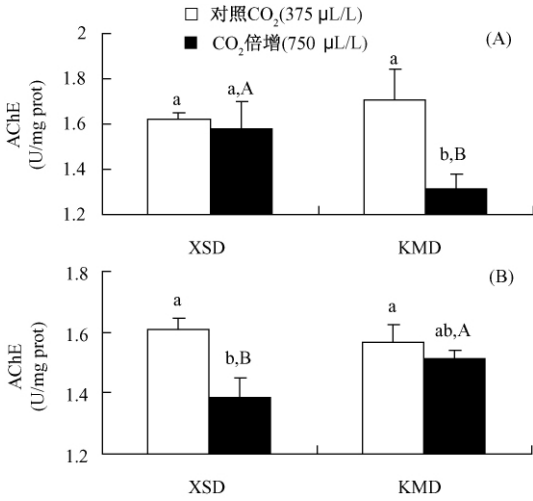


图 1 CO₂ 浓度升高对接种危害转 Bt 水稻(克螟稻)及其亲本水稻(秀水 11) 12 h(A) 和 30 h(B) 的二化螟老熟幼虫乙酰胆碱酯酶(AChE)活力的影响 KMD:克螟稻,XSD:秀水 11;不同小写字母表示同一接种时间危害不同 CO₂ 浓度下生长的转 Bt 水稻及其对照亲本的老熟幼虫体内酶活力差异显著,不同大写字母表示接种在相同 CO₂ 浓度下生长的同种水稻上危害不同时间的二化螟老熟幼虫体内酶活力差异显著;LSD: $P < 0.05$ 。(下同)

2.3 二化螟体内 SOD 活性变化

CO₂ 浓度水平、水稻品种和接种危害时间对二化螟幼虫体内 SOD 活力影响与其对 POD 活力的影响恰恰相反(图 3)。与对照 CO₂ 处理相比,高 CO₂ 处理下接种危害亲本水稻 12 h 和 30 h 后幼虫体内 SOD 活力分别提高 18.2% ($P < 0.05$) 和 6.0%,而取食转 Bt 水稻时其 SOD 活力分别显著降低 67.5% 和 61.2% ($P < 0.05$)。此外,与亲本水稻处理相比,对照 CO₂ 处理下接种危害转 Bt 水稻 12 h 和 30 h 后二化螟幼虫体内 SOD 活性分别显著提高 45.0% 和 12.4%,而高 CO₂ 处理下接种危害转 Bt 水稻 12 h 和 30 h 后其 SOD 活力分别显著降低 18.8% 和 9.1% ($P < 0.05$)。接种危害 12 h 和 30 h 处理间,二化螟幼虫取食转 Bt 水稻和对照亲本水稻后其 SOD 活力分别显著显著升高 11.6% 和 44.0% (对照 CO₂ 处理),44.5% 和 29.1% ($P < 0.05$; 高 CO₂ 处理)。

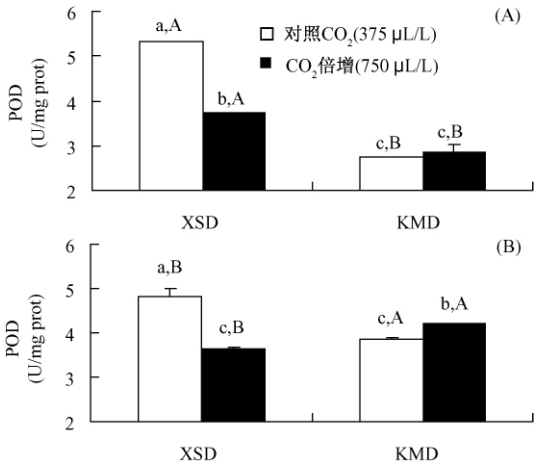


图 2 CO₂ 浓度升高对接种危害转 Bt 水稻(克螟稻)及其亲本水稻(秀水 11) 12 h(A) 和 30 h(B) 的二化螟老熟幼虫过氧化物酶(POD)活力的影响

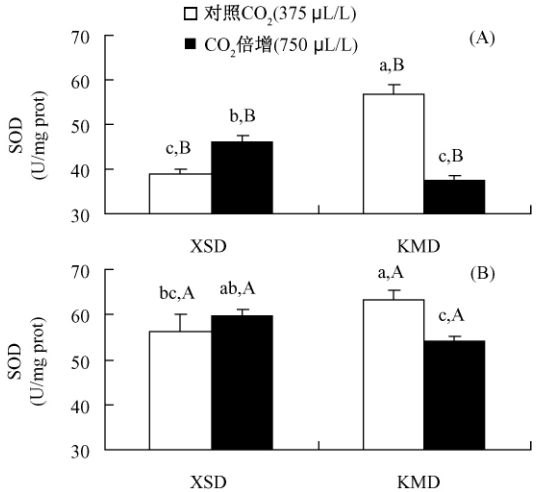


图 3 CO₂ 浓度升高对接种危害转 Bt 水稻(克螟稻)及其亲本水稻(秀水 11) 12 h(A) 和 30 h(B) 的二化螟老熟幼虫超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响

2.4 二化螟体内 CAT 活性变化

随 CO₂ 浓度升高二化螟幼虫体内 CAT 活力变化不显著 ($P > 0.05$; 表 1),三因子方差分析(表 1)水稻品种对二化螟幼虫 CAT 影响不显著,而水稻品种与接种危害时间之间存在显著的交互作用 ($P < 0.01$; 表 1)。与亲本水稻处理相比,对照 CO₂ 浓度下,接种危害转 Bt 水稻 12 h 后二化螟幼虫体内 CAT 活力显著升高 79.0% ($P < 0.05$; 图 4A),而取食危害 30 h 后

又显著降低 31.5% ($P < 0.05$; 图 4B)。此外, CO_2 浓度水平、水稻品种和接种危害时间之间还存在显著的交互作用 ($P < 0.001$; 表 1)。接种危害 12 h 和 30 h 处理间, 二化螟幼虫取食转 Bt 水稻和对照亲本水稻后其 CAT 活性分别显著显著升高 34.4% 和 250.9% (对照 CO_2 处理), 112.2% 和 123.3% ($P < 0.05$; 高 CO_2 处理)。

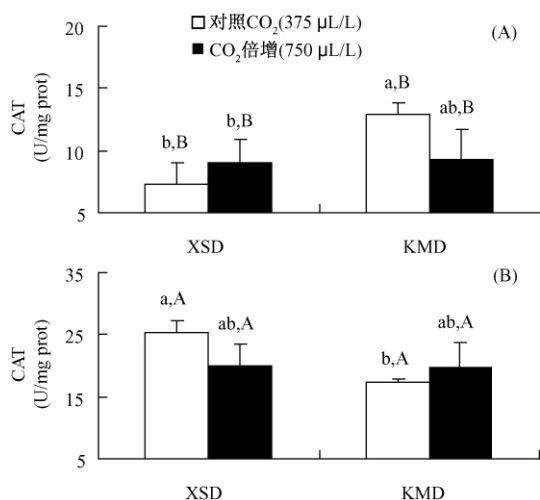


图 4 CO_2 浓度升高对接种危害转 Bt 水稻 (克螟稻) 及其亲本水稻 (秀水 11) 12 h (A) 和 30 h (B) 的二化螟老熟幼虫过氧化氢酶 (CAT) 活力的影响

3 讨论

国内外许多研究表明昆虫在农药、温湿度降雨等环境、食料不适、水缺乏等不良环境中, 其生理生化过程会发生某些改变而使其适应下来^[18~22]。大气 CO_2 浓度升高会导致昆虫体内代谢变化, 同时其导致的转 Bt 水稻营养品质等也会引发昆虫生理代谢变化。可见, 在 CO_2 浓度变化引起的直接和间接作用共同影响下, 二化螟取食转 Bt 水稻后体内关键代谢酶 (如乙酰胆碱酯酶 AChE) 和保护酶 (如过氧化物酶 POD、超氧化物歧化酶 SOD 和过氧化氢酶 CAT) 等活力的变化可维持着虫体内相对稳定的环境。本研究表明, 二化螟取食不同水稻品种时其体内 AChE 活力对 CO_2 浓度的敏感性虽有不同, 但差异未达到显著性。长时间高浓度

CO_2 处理会导致昆虫体内 AChE 活力的降低, 这与李灿等^[23]的研究结果一致, 这种变化可能与被处理昆虫体内的神经递质乙酰胆碱的积累有关。乙酰胆碱积累, AChE 活力降低, 最终导致昆虫的死亡, 其机制有待进一步研究。

保护酶作为生物体内一类重要酶系, 其活力变化是生物适应逆境的主要指示指标之一。据推测保护酶可直接参与 Bt 杀虫蛋白的代谢作用并与其抗性产生有关^[24,25], 因此, 当取食转 Bt 水稻时昆虫体内保护酶会发生变化, 扰乱氧自由基的正常清除, 进而对昆虫产生毒害作用^[26]。本试验也证实短时间 (12 h) 接种危害取食 Bt 蛋白后, 保护酶 SOD 和 CAT 的活力都升高, 但不能维持长时间应激水平。3 个主要的保护酶通过分工协调作用使虫体内氧自由基维持一个较低水平, 进而提高生物体的抗逆能力^[27,28]。其中 SOD 可清除 O_2^- 并反应生成 H_2O_2 ; CAT 能进一步催化 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2^- ; POD 则具有分解 H_2O_2 的能力。高浓度 CO_2 环境和取食 Bt 蛋白均导致二化螟幼虫 SOD 活力在短时间内升高, 说明高浓度 CO_2 和取食 Bt 蛋白都会导致二化螟体内 O_2^- 的积累。初期处理时在清除二化螟体内 H_2O_2 方面 POD 起主要作用, CAT 作用不明显。王世贵^[29]研究表明, 二化螟 3 龄 (5 龄) 幼虫取食克螟稻 24 h (72 h) 后死亡率高达 50%。可见, 高 CO_2 浓度及 Bt 毒素共同作用下二化螟死亡加剧。本研究保护酶活性最终降低, 此时二化螟体内积累大量氧自由基, 破坏了体内平衡环境, 是虫体最终死亡的原因之一。

CO_2 浓度升高和取食转基因水稻品种对二化螟幼虫而言为胁迫作用, 分析两者单独作用时酶系均表现出 AChE 和 POD 活性降低, SOD 活性升高, CAT 初期升高后期降低。两因子交互作用时酶系变化趋势相同, 但仅对 POD 和 SOD 的活性变化有显著性影响。关于高浓度 CO_2 对保护酶影响及 Bt 毒素对乙酰胆碱酯酶的影响研究较少, 本试验将 CO_2 浓度和转 Bt 水稻品种结合起来, 研究两者对二化螟体内代谢酶乙酰胆碱酯酶, 超氧化物歧化酶、过氧化物酶

和过氧化氢酶 3 种保护酶的影响,有助于进一步明确大气 CO₂ 浓度升高环境下靶标害虫二化螟对转 Bt 水稻的生理生态学响应机理。

参 考 文 献

- Feitelson J. S. , Payne J. , Kim L. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Biocontrol Science and Technology*, 1992, **10**(3): 271 ~ 275.
- Feitelson J. S. The *Bacillus thuringiensis* family tree, In: Kim L. (ed.). *Advanced Engineered Pesticides*. New York: Marcel Dekker, Inc. , 1993. 63 ~ 71.
- Meadows M. P. *Bacillus thuringiensis* in the environment: Ecology and risk management. In: Entwistle P. F. , Cory J. S. , Baily M. J. , et al. (eds.). *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. New York: Wiley, 1993. 193 ~ 220.
- 黄英姿. 越冬二化螟幼虫存活发育的气候因素分析. 信阳师范学院学报, 1987, **1**: 78 ~ 82.
- 李仲惺, 葛慧蓉. 温度变化与螟虫发生的关系. 浙江气象科技, 2000, **21**(3): 20 ~ 21.
- 薛进, 戈峰, 黎家文, 等. 二化螟与作物的相互关系及其影响因素. 昆虫知识, 2005, **42**(3): 259 ~ 263.
- Houghton J. T. , Meirs Filho L. G. , Callander B. A. , et al. *Climate Change 1995: the Science of Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 584.
- Houghton J. T. , Ding Y. H. , Griggs D. J. , et al. *Climate Change 2001: the Scientific Basis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. 944.
- Watson R. T. , Zinyowera M. C. , Moss R. H. *Climate Change 1995: Impacts, Adaptations and Mitigation of Climate Change: Scientific-Technical Analysis*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 878.
- 吴坤君. 空气污染对昆虫的影响. 昆虫知识, 1988, **5**(2): 122 ~ 127.
- 吴坤君. 大气中 CO₂ 含量增加对植物 - 昆虫关系的影响. 应用生态学报, 1993, **4**(2): 198 ~ 202.
- Poorter H. , Berkel Y. , Baxter R. , et al. The effects of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C3 species. *Plant Cell and Environment*, 1997, **20**(4): 472 ~ 482.
- Tuchman N. C. , Wetzel R. G. , Rier S. T. , et al. Elevated atmospheric CO₂ lowers leaf litter nutritional quality for stream ecosystem food webs. *Global Change Biology*, 2002, **8**(2): 163 ~ 170.
- Chen F. J. , Wu G. , Parajulee M. N. , et al. Long-term impacts of elevated carbon dioxide and transgenic Bt cotton on performance and feeding of three generations of cotton bollworm. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2007, **124**(1): 27 ~ 35.
- 陈法军, 戈峰. 一套用于研究 CO₂ 浓度增加对植物-昆虫相互作用影响的设备——CDCC-I 型密闭式动态 CO₂ 气室. 昆虫知识, 2004, **41**(3): 279 ~ 281.
- 陈法军, 戈峰, 苏建伟. 用于研究大气 CO₂ 浓度升高对农田有害生物影响的田间试验装置 - 改良的开顶式气室. 生态学杂志, 2005, **24**(5): 585 ~ 590.
- Brodford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248 ~ 254.
- Fridovich I. Oxygen is toxic! *Bioscience*, 1977, **27**(7): 462.
- 常晓娜, 高慧璟, 陈法军, 等. 环境湿度和降雨对昆虫的影响. 生态学杂志, 2008, **27**(4): 619 ~ 625.
- 赵惠燕, 袁锋. 褐蚜体色变化的生态遗传及 DNA 分子证据. 中国科技文摘, 1996, **1**: 109.
- 杨贵军, 吴涛, 杨乐, 等. 狼毒提取物对枸杞蚜虫的生物活性及其体内酶活性的影响. 四川动物, 2007, **26**(1): 8 ~ 11.
- 杨效文, 张孝羲, 陈晓峰, 等. 烟蚜抗性的生化及分子生物学机制. 世界农业, 1998, **235**(11): 37 ~ 38.
- 李灿, 李子忠, 周波, 等. 高浓度二氧化碳对药材甲和烟草甲乙酰胆碱酯酶活性的影响. 植物保护学报, 2007, **6**(12): 642 ~ 645.
- Ding S. Y. , Li H. Y. , Li X. F. , et al. Effects of two kinds of transgenic poplar on protective enzymes system in the midgut of larvae of American white moth. *Journal of Forestry Research*, 2001, **12**(2): 119 ~ 122.
- 徐艳玲, 王振营, 何康来, 等. 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. 昆虫学报, 2006, **49**(4): 562 ~ 567.
- 张巍, 张志罡, 付秀芹, 等. 转 Bt 基因水稻对稻纵卷叶螟幼虫体内三种保护酶活性的影响. 昆虫学报, 2008, **51**(10): 1022 ~ 1027.
- 李周直, 沈惠娟, 蒋巧根, 等. 几种昆虫体内保护酶系统活性的研究. 昆虫学报, 1994, **37**(4): 399 ~ 403.
- 冯从经, 戴华国, 武淑文. 褐飞虱高温条件下应激反应及体内保护酶系活性的研究. 应用生态学报, 2001, **12**(3): 409 ~ 413.
- 王世贵. Bt 水稻对靶标害虫二化螟的生物学与病理学效应. 博士学位论文. 浙江: 浙江大学, 2002.