

# 绿僵菌与FKBP52联合使用对西花蓟马的毒力

尹仙枫<sup>1,2</sup> 朱凯辉<sup>2</sup> 王芳<sup>3</sup> 张蓉<sup>3</sup> 王福莲<sup>1\*</sup> 涂雄兵<sup>2\*</sup>

(1. 长江大学农学院, 昆虫研究所, 农林病虫害预警与调控湖北省工程技术研究中心, 荆州 434025;

2. 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 100193;

3. 宁夏农林科学院植物保护研究所, 银川 750002)

**摘要:** 为阐明绿僵菌与昆虫免疫抑制蛋白的增效机理, 采用浸渍法测定昆虫免疫抑制蛋白FKBP52与金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 对西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 的毒力和其体内羧酯酶(carboxylesterase, CarE)、谷胱甘肽-S转移酶(glutathione-S transferase, GST)、酚氧化酶(phenoloxidase, PO)及几丁质酶活性的变化。结果显示, 金龟子绿僵菌和FKBP52蛋白联合使用对西花蓟马的致死中时LT<sub>50</sub>为7.32 d, 优于绿僵菌单用(10.87 d)或FKBP52蛋白单用的(14.15 d)。金龟子绿僵菌和FKBP52蛋白联合使用9 d时, 西花蓟马的累计死亡率达81.11%, 显著高于绿僵菌单用(45.56%)或FKBP52蛋白单用的(36.67%); 金龟子绿僵菌和FKBP52蛋白联合使用的协同毒力指数为24.10, 表现为增效作用。金龟子绿僵菌与FKBP52蛋白联合使用1 d后, 西花蓟马体内CarE和PO活性小于金龟子绿僵菌单用后的活性; 联合使用2 d后, 西花蓟马体内几丁质酶活性小于绿僵菌单用后的活性, 而CarE和GST活性均大于金龟子绿僵菌单用后的活性; 联合使用3 d后, 西花蓟马体内几丁质酶、CarE和PO活性均大于绿僵菌单用后的活性。表明与金龟子绿僵菌单用相比, 金龟子绿僵菌和FKBP52蛋白联合使用后西花蓟马体内CarE、GST、PO和几丁质酶活性抑制或诱导效应与时间有关, 这可能是两者具有增效作用的重要机制。

**关键词:** 金龟子绿僵菌; 西花蓟马; 免疫抑制蛋白; 保护酶; 解毒酶

## Synergistic toxicity of *Metarhizium anisopliae* and FKBP52 against the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*

Yin Xianfeng<sup>1,2</sup> Zhu Kaihui<sup>2</sup> Wang Fang<sup>3</sup> Zhang Rong<sup>3</sup> Wang Fulian<sup>1\*</sup> Tu Xiongbing<sup>2\*</sup>

(1. Forewarning and Management of Agricultural and Forestry Pests, Hubei Engineering Technology Center, Institute of

Entomological Science, College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei Province, China; 2. State

Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of

Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture

and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, Ningxia Hui Autonomous Region, China)

**Abstract:** To elucidate the synergistic mechanism of *Metarhizium anisopliae* and insect immunosuppressive proteins, the toxicity of the immunosuppressive protein FKBP52 and *M. anisopliae* to western flower thrips *Frankliniella occidentalis* were evaluated. The activities of carboxylesterase (CarE), glutathione-S transferase (GST), phenoloxidase (PO), and chitinase in *F. intonsa* also were assessed using the impregnation method. The results revealed that the median lethal time (LT<sub>50</sub>) for the combination of *M. anisopliae* and FKBP52 protein against *F. intonsa* was 7.32 d, demonstrating enhanced effectiveness compared to *M. anisopliae* (10.87 d) or FKBP52 protein (14.15 d) alone. When combined for nine

days, the mortality rate of *F. intonsa* reached 81.11%, significantly higher than the rates observed with *M. anisopliae* (45.56%) or FKBP52 protein (36.67%) alone. The synergistic index of this mixture was 24.10, indicating a notable synergistic effect. Compared to the use of *M. anisopliae* alone, the activity levels of CarE and PO in *F. intonsa* initially decreased and then increased from day 1 to day 3 following the combined application of *M. anisopliae* and FKBP52 protein. The GST activity was significantly elevated only on day 2. Chitinase activity decreased on day 2 and then increased on day 3. These findings suggest that the time-dependent modulation of CarE, GST, PO, and chitinase activities in *F. intonsa* following the combined application of *M. anisopliae* and FKBP52 protein could be a crucial mechanism underpinning their synergistic effect.

**Key words:** *Metarhizium anisopliae*; *Frankliniella occidentalis*; insecticidal protein; protective enzyme; detoxification enzyme

枸杞是宁夏回族自治区(简称宁夏)最具地方特色和品牌优势的主导农产品(王昊等,2021),全区枸杞种植面积达5.67万 $\text{hm}^2$ ,枸杞干果约占全国总产量的55%(张俊宁和赵洁,2018)。近年来,西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 已成为枸杞生产中为害最重、最难防治的害虫之一,对枸杞产业产生了巨大冲击(马莹和张文华,2019)。西花蓟马寄主范围广,为害蔬菜、花卉等多种重要经济作物,除直接取食外,还能通过传播植物病毒如番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)和风仙花坏死斑病毒(impatiens necrotic spot virus, INSV)等(沈登荣,2015)对作物造成更大的为害(Abd-El-Haliem et al.,2018)。

目前,西花蓟马主要依靠化学杀虫剂进行防治,但因其具有孤雌生殖且世代周期短等特点,易产生抗药性(Gao et al.,2012),其已经对阿维菌素、虫螨脲、啶虫脒和吡虫啉等药剂(王圣印等,2014)及多杀菌素类药剂(万岩然等,2016)产生了不同程度抗性,此外,化学杀虫剂会污染环境,影响人类健康。细菌、苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 和昆虫病原真菌(包括白僵菌 *Beauveria* 和绿僵菌 *Metarhizium*)等生物防治剂对人类、作物和昆虫天敌相对安全,对环境友好(黄鹏等,2019),被用于防治蚊子(Scholte et al.,2004)、蝗虫和蚱蜢(Lomer et al.,2001;Kassa et al.,2004)等各种害虫,但生物防治剂作用慢,一些学者为提高其杀虫效果也进行了相应研究,如Federici et al.(2008)和St Leger & Wang(2010)利用重组DNA技术设计真菌过表达内源性蛋白或外源性毒素来提供其杀虫效果;Richards et al.(2011)将免疫抑制蛋白rVPr1和白僵菌混合后注入甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 体内,甘蓝夜蛾的死亡率显著增加。

FKBP52是他克莫司(tacrolimus,又名FK506)

结合蛋白(FK506 binding protein,FKBP)中的一种,FKBP是一类以胞内蛋白为主的蛋白质超家族,因其与FK506的相互作用而得名。FKBP具有肽基脯氨酰顺反异构酶活性,可催化多肽或蛋白质底物中的肽-脯氨酸顺反子的转换,从而影响其活性、磷酸化状态和蛋白质间相互作用等(Harrar et al.,2001;Harikishore & Yoon,2015)。FKBP能够结合环孢素a(cyclosporin a,CsA)、FK506或雷帕霉素,进而发挥其免疫抑制效应(Solassol et al.,2011)。FKBP和FK506的二元复合体能抑制免疫细胞中钙调磷酸酶的活性,从而影响磷酸化信号途径,使免疫细胞丧失功能(Geisler & Bailly,2007)。此外,FKBP还有调节细胞周期、钙离子通道活性以及发育等功能,如朱佳(2009)证实FKBP与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 滞育有关;田野等(2021)用FKBP52饲喂东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 后,显著提升了绿僵菌对东亚飞蝗的致死率,但FKBP52是否能提高绿僵菌对西花蓟马的防效尚不清楚。

为研究FKBP52和绿僵菌混合是否对西花蓟马有增效作用及其机理,本试验通过测定金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 和FKBP52单用及联合使用对西花蓟马的生物毒力,同时测定处理1~3 d后西花蓟马体内解毒酶——羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)、谷胱甘肽-S转移酶(glutathione-S transferase, GST)、酚氧化酶(phenoloxidase, PO)及保护酶——几丁质酶的活性,阐明绿僵菌与昆虫免疫抑制蛋白的增效机理,以期对西花蓟马的绿色防控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株、昆虫和植物:金龟子绿僵菌菌株

IMI330189,于本实验室长期保存,将菌株接种到含0.5%酵母粉的马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上,于28℃人工气候培养箱中培养8 d,刮下所有孢子粉,储存备用。西花蓟马为实验室饲养纯化种群,于温度(26±1)℃、相对湿度(80±5)%、光周期14 L:10 D的人工气候培养箱中饲养30代以上,取羽化后2 d的西花蓟马成虫供试。蛇豆 *Trichosanthes anguina* 购于农贸市场,清洗后用派斯德百毒杀浸泡消毒10 min,再用清水清洗3次,取长5 cm蛇豆荚供试和饲喂西花蓟马。

**培养基:** PDA培养基成分为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、酵母粉5 g、琼脂粉20 g,蒸馏水定容至1 L,121℃高压灭菌25 min; LB(Luria-Bertani)液体培养基成分为酵母粉5 g、胰蛋白胨10 g、氯化钠10 g,蒸馏水定容至1 L,121℃高压灭菌25 min。

**试剂、农药和仪器:** 蛋白Marker和Ni-NTA亲和层析柱,北京全式金生物技术股份有限公司; CarE试剂盒、GST试剂盒、PO试剂盒和几丁质酶酶联免疫(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,苏州科铭生物技术有限公司; pET21-b载体,本实验室长期保存;其他试剂均为国产分析纯。派斯德百毒杀(溴化二甲基二癸基羟铵),上海派斯德生化有限公司。PGC-450人工气候培养箱,迅能(北京)仪器有限公司; Nan-300微量分光光度计,杭州奥盛仪器有限公司; JY96-II-N超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司; XB.K.25血球计数板,北京索莱宝科技有限公司; 垂直蛋白凝胶电泳仪,美国伯乐Bio-Rad; 饲养装置,自制,一次性塑料杯杯壁上开1个边长为2.5 cm的方孔,用孔径0.075 mm的纱布将封孔,杯口用封口膜密封。

## 1.2 方法

### 1.2.1 FKBP52蛋白表达与纯化

FKBP52蛋白表达及纯化参考田野等(2021)方法。携带FKBP52蛋白的大肠杆菌 *Escherichia coli* 原核菌株由本实验室前期构建,将携带FKBP52蛋白的大肠杆菌原核菌株置于LB(氨苄)液体培养基中,于37℃下培养,待吸光度 $OD_{600\text{nm}}$ 为0.5~0.6时加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG),至终浓度为0.5 mmol/mL,于16℃下诱导表达12 h;于5 000 r/min下离心15 min,取沉淀并用Tris-HCl溶液重悬,超声波破碎5 s,暂停5 s,重复99个循环后于4℃、9 000 r/min下离心10 min,取上清液。用镍柱亲和层析进行蛋白纯化,用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium

dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测纯化蛋白的浓度(田野等,2021)。经测定FKBP52蛋白浓度为1.2 mg/mL,用Tris-HCl溶液配制成1 mg/mL的母液。

### 1.2.2 FKBP52蛋白和绿僵菌对西花蓟马的毒力测定

称取1 g金龟子绿僵菌孢子粉置于0.05%的吐温80溶液中,用涡旋仪使其混合均匀,随后用血球计数板计数,配制成浓度为 $2 \times 10^9$ 个孢子/mL的金龟子绿僵菌孢子悬浮液作为母液。

采用浸渍法测定金龟子绿僵菌IMI330189孢子悬浮液和FKBP52蛋白对西花蓟马的毒力。用吸虫工具将羽化2 d的西花蓟马成虫接入到饲养装置中饥饿处理6 h,每个装置30头。取长50 mm蛇豆荚分别置于以下4个处理中浸泡10 min,处理1:终浓度为0.5 mg/mL pET21-b空载体诱导表达的蛋白(CK),诱导方法和条件同FKBP52;处理2:终浓度为0.5 mg/mL的FKBP52蛋白液;处理3:终浓度为 $2 \times 10^8$ 个孢子/mL的金龟子绿僵菌孢子悬浮液;处理4:FKBP52蛋白液与金龟子绿僵菌孢子悬液混合,金龟子绿僵菌孢子终浓度为 $2 \times 10^8$ 个孢子/mL,FKBP52蛋白液终浓度为0.5 mg/mL。将浸泡的蛇豆荚取出后分别置于饲养装置中,每个装置中放1根蛇豆荚,每个处理重复5次,封口后将饲养装置放入人工气候培养箱中,人工气候箱的条件同1.1。前3 d饲喂相同处理的蛇豆荚,每天更换1次,从第4天起,用新鲜蛇豆荚饲喂直至试验结束,每天观察并记录各处理试虫的死亡情况,用细毛笔轻触虫体无反应则记为死亡,9 d后计算实际死亡率和协同毒力指数,并采用直线回归方程计算致死中时 $LT_{50}$ 。协同毒力指数=(混剂实际死亡率-混剂理论死亡率)/混剂理论死亡率 $\times 100$ ,混剂理论死亡率=1-(1- $P_a$ ) $\times$ (1- $P_b$ ),式中 $P_a$ 、 $P_b$ 分别为2种单独试剂处理后的死亡率,其中协同毒力指数 $\geq 20$ 时为增效作用,-20<协同毒力指数<20时为相加作用,协同毒力指数 $\leq -20$ 时为拮抗作用。

### 1.2.3 西花蓟马体内解毒酶和保护酶活性的测定

1.2.2处理试虫分别于药后1、2和3 d取样,每个处理每个时间取45头,3次重复,每个重复单独装入1.5 mL离心管中,液氮速冻15 min后于-80℃保存备用。参照侯晓琳等(2018)和樊宗芳等(2022)方法制备CarE酶液,略加改进,分别将每个处理每个时间的45头西花蓟马放入2 mL离心管中,加入100  $\mu$ L浓度为0.2 mol/L的磷酸缓冲液(pH 6.0),于冰上研磨匀浆,匀浆液于4℃、10 000 r/min下离心15 min,

收集上清液即为酶源,按照 CarE 试剂盒说明书测定西花蓟马体内 CarE 活性。参照侯晓琳等(2018)和樊宗芳等(2022)方法制备 GST 酶液,略加改进,分别将每个处理每个时间的 45 头西花蓟马放入 2 mL 离心管中,加入 100  $\mu$ L 浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.4),于冰上研磨匀浆,将匀浆液于 4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 下离心 15 min,收集上清液即为酶源,按照 GST 试剂盒说明书测定西花蓟马体内 GST 活性。参考马燕等(2010)和方月等(2017)方法制备 PO 酶液,略加改进,分别将每个处理每个时间的 45 头西花蓟马放入 2 mL 离心管中,加入 100  $\mu$ L 浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0),于冰上研磨匀浆,将匀浆液于 4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 下离心 15 min,收集上清液即为酶源,按照 PO 试剂盒测定西花蓟马体内 PO 活性。参考周利琳等(2009)方法制备几丁质酶酶液,略加改进,分别将每个处理每个时间的 45 头

西花蓟马放入 2 mL 离心管中,加入 100  $\mu$ L 浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 6.6),于冰上研磨匀浆,将匀浆液于 4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 下离心 15 min,收集上清液即为酶源,按照 ELISA 试剂盒说明书测定西花蓟马体内几丁质酶活性。

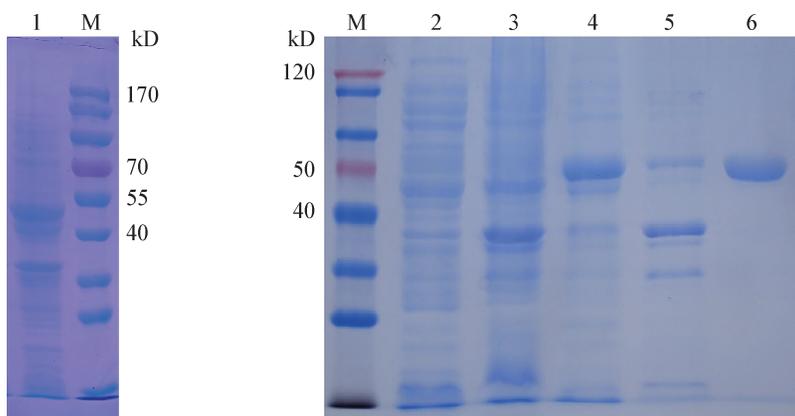
### 1.3 数据分析

采用 SPSS 26.0 软件对试验数据进行统计分析,采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 FKBP52 蛋白表达与提取

将携带 FKBP52 蛋白的大肠杆菌原核菌株经 IPTG 诱导表达,获得 FKBP52 蛋白。经过 15% SDS-PAGE 电泳检测分析,获得了目的蛋白 FKBP52,分子量大小为 46 kD,与预期相符。经镍柱亲和层析纯化后,得到 FKBP52 纯蛋白(图 1)。



M: Marker; 1~3: pET21-b 诱导后的原液、上清和沉淀; 4~5: 具有 FKBP52 蛋白的 pET21-b 诱导后上清和沉淀; 6: 纯化的 FKBP52 蛋白。M: Marker; 1~3: induced solution, precipitation, and supernatant of pET21-b; 4~5: induced precipitation and supernatant of pET21-b with FKBP52; 6: purified FKBP52 protein.

图 1 重组蛋白 FKBP52 表达分析及其蛋白纯化

Fig. 1 Analysis of protein expression and purification of recombinant protein FKBP52

### 2.2 FKBP52 蛋白与金龟子绿僵菌对西花蓟马的毒力

金龟子绿僵菌单用时,其对西花蓟马的  $LT_{50}$  为 10.87 d,处理 9 d 时西花蓟马的累计死亡率为 45.56%;FKBP52 蛋白单用时,其对西花蓟马的  $LT_{50}$  为 14.15 d,处理 9 d 时西花蓟马的累计死亡率为 36.67%;当 FKBP52 蛋白和绿僵菌联合使用时,其对西花蓟马的  $LT_{50}$  为 7.32 d,分别较 FKBP52 蛋白单用及绿僵菌单用缩短了 6.83 d 和 3.55 d,处理 9 d 时西花蓟马的累计死亡率为 81.11%(表 1),累计死亡率分别较 FKBP52 蛋白单用及绿僵菌单用显著提升了 44.44 个百分点和 35.55 个百分点 ( $P < 0.05$ , 表 1)。FKBP52 蛋白与绿僵菌联合使用 9 d 时,混剂理论累计死亡率为 65.51%,混剂实际累计死亡率比混剂理

论死亡率提升了 15.60 个百分点。两者联合使用的协同毒力指数为 24.10,该组合表现为增效作用。

### 2.3 不同处理对西花蓟马相关解毒酶活性的影响

#### 2.3.1 对西花蓟马体内 CarE 活性的影响

金龟子绿僵菌与 FKBP52 蛋白联合使用 1 d 后西花蓟马体内 CarE 活性显著小于金龟子绿僵菌单用和 FKBP52 蛋白单用后的活性 ( $P < 0.05$ ),金龟子绿僵菌单用及其与 FKBP52 蛋白联合使用后西花蓟马体内 CarE 活性均被抑制,均分别较对照显著降低了 7.9% 和 21.7% ( $P < 0.05$ );金龟子绿僵菌与 FKBP52 蛋白联合使用 2 d 后西花蓟马体内 CarE 活性显著大于金龟子绿僵菌单用和 FKBP52 蛋白单用后的活性 ( $P < 0.05$ ),与对照相比,金龟子绿僵菌单用、FKBP52

蛋白单用及其与金龟子绿僵菌联合使用后西花蓟马体内 CarE 活性均被抑制,分别较对照显著降低了 28.2%、27.7% 和 23.0% ( $P<0.05$ );金龟子绿僵菌与 FKBP52 蛋白联合使用 3 d 后西花蓟马体内 CarE 活性显著大于金龟子绿僵菌单用和 FKBP52 蛋白单用

后的活性( $P<0.05$ ),其中金龟子绿僵菌单用后的活性显著小于 FKBP52 蛋白单用后的活性( $P<0.05$ ),只有金龟子绿僵菌单用后西花蓟马体内 CarE 活性被显著抑制,较对照显著降低了 37.2% ( $P<0.05$ ,表 2)。

表 1 不同处理时间后西花蓟马的累计死亡率

Table 1 Cumulative mortality rate of *Frankliniella occidentalis* after different treatment durations %

处理 Treatment	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d
对照 CK	0.00± 0.00 a	0.00± 0.00 b	3.33± 3.33 a	5.56± 1.92 a	5.56± 1.92 a	7.78± 1.92 a	11.11± 5.09 b	15.56± 1.92 b	17.78± 5.09 b
FKBP52 蛋白 FKBP52 protein	0.00± 0.00 a	2.22± 1.92 ab	5.56± 3.84 a	6.67± 3.33 a	7.78± 3.84 a	13.33± 8.81 a	17.78± 6.93 b	24.44± 9.62 b	36.67± 15.27 b
金龟子绿僵菌 <i>Metarhizium anisopliae</i>	2.22± 1.92 a	4.44± 1.92 a	6.67± 0.00 a	10.00± 3.33 a	14.44± 3.84 a	25.56± 10.71 a	27.78± 9.18 ab	33.33± 16.66 b	45.56± 22.69 b
金龟子绿僵菌+FKBP52 蛋白 <i>Metarhizium anisopliae</i> + FKBP52 protein	2.22± 1.92 a	4.44± 1.92 a	5.56± 3.85 a	7.78± 5.09 a	18.89± 18.95 a	31.11± 20.36 a	43.33± 20.81 a	56.67± 13.33 a	81.11± 6.93 a

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ( $P<0.05$ )。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ ).

表 2 不同处理对西花蓟马体内相关解毒酶和几丁质酶活性的影响

Table 2 Effects of different treatments on the detoxifying enzyme activities and chitinase activity of *Frankliniella occidentalis*

处理 Treatment	GST 活性 Glutathione-S transferase activity/(U/L)			PO 活性 Phenoloxidase activity/(U/L)			CarE Carboxylesterase activity/(U/L)			几丁质酶活性 Chitinase activity/(U/L)		
	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
对照 CK	4.80± 0.08 b	6.14± 0.19 b	6.39± 0.13 a	53.69± 0.87 a	55.86± 3.69 a	53.01± 4.43 a	27.57± 0.15 a	27.80± 0.57 a	22.90± 1.76 ab	28.77± 0.24 b	34.15± 0.74 ab	34.79± 0.34 a
金龟子绿僵菌 <i>Metarhizium anisopliae</i>	5.44± 0.34 a	5.37± 0.29 c	5.65± 0.25 b	38.57± 0.95 c	52.42± 1.09 a	39.83± 1.65 b	25.39± 0.66 b	19.95± 0.71 c	14.37± 0.80 c	32.69± 0.90 a	35.46± 0.67 a	29.64± 0.86 c
FKBP52 蛋白 FKBP52 protein	5.17± 0.11 ab	6.95± 0.13 a	6.24± 0.12 a	42.14± 1.74 b	51.92± 0.76 a	43.18± 0.18 b	28.80± 0.60 a	20.09± 0.08 c	22.17± 0.82 b	31.86± 0.04 a	34.25± 0.14 ab	32.07± 0.81 b
金龟子绿僵菌+ FKBP52 蛋白 <i>Metarhizium anisopliae</i> + FKBP52 protein	5.39± 0.29 ab	6.55± 0.05 ab	6.03± 0.14 ab	33.24± 1.52 d	52.34± 1.04 a	50.64± 0.91 a	21.60± 0.48 c	21.42± 0.33 b	25.75± 1.23 a	31.58± 0.77 a	33.95± 0.13 b	32.44± 0.88 b

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ( $P<0.05$ )。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ ).

### 2.3.2 对西花蓟马体内 PO 活性的影响

金龟子绿僵菌与 FKBP52 蛋白联合使用 1 d 后西花蓟马体内 PO 活性显著小于金龟子绿僵菌单用和 FKBP52 蛋白单用后的活性 ( $P<0.05$ ),其中金龟子绿僵菌单用后的活性显著低于 FKBP52 蛋白单用后的活性 ( $P<0.05$ ),与对照相比,金龟子绿僵菌单用、FKBP52 蛋白单用及其与金龟子绿僵菌联合使用后西花蓟马体内 PO 活性均被显著抑制,分别较对照降低了 28.2%、21.5% 和 38.1% ( $P<0.05$ );处理 2 d

时,4 个处理的活性之间均无显著差异;金龟子绿僵菌与 FKBP52 蛋白联合使用 3 d 后西花蓟马体内 PO 活性显著大于金龟子绿僵菌单用和 FKBP52 蛋白单用后的活性 ( $P<0.05$ ),与对照相比,金龟子绿僵菌单用、FKBP52 蛋白单用后西花蓟马体内 PO 活性均被显著抑制,分别较对照显著降低了 25.0% 和 19.0% ( $P<0.05$ ,表 2)。

### 2.3.3 对西花蓟马体内 GST 活性的影响

与对照相比,金龟子绿僵菌单用 1 d 后西花蓟马

体内GST活性被激活,较对照显著提高了13.3%( $P < 0.05$ ),但与其他2个处理之间差异不显著;FKBP52蛋白单用及其与金龟子绿僵菌联合使用2 d后西花蓟马体内GST活性显著大于金龟子绿僵菌单用后的活性( $P < 0.05$ ),与对照相比,金龟子绿僵菌单用后西花蓟马体内GST活性被显著抑制,较对照显著降低了12.6%( $P < 0.05$ ),FKBP52蛋白单用后西花蓟马体内GST活性被激活,较对照显著提高了13.2%( $P < 0.05$ );与对照相比,金龟子绿僵菌单用3 d后西花蓟马体内GST活性被显著抑制,较对照降低了11.6%( $P < 0.05$ ),也显著低于FKBP52蛋白单用后的活性,但与其与FKBP52蛋白联合使用的差异不显著( $P < 0.05$ ,表2)。

#### 2.4 不同处理对西花蓟马几丁质酶的影响

与对照相比,金龟子绿僵菌单用、FKBP52蛋白单用及其与金龟子绿僵菌联合使用1 d后,西花蓟马体内几丁质酶活性均被激活,均分别较对照提高了13.7%、10.8%和9.8%( $P < 0.05$ ),但三者之间差异不显著;金龟子绿僵菌与FKBP52蛋白联合使用2 d后,西花蓟马体内几丁质酶活性显著小于绿僵菌单用的活性( $P < 0.05$ ),但与其他2个处理差异不显著;FKBP52蛋白单用及其与金龟子绿僵菌联合使用3 d后,西花蓟马体内几丁质酶活性显著大于金龟子绿僵菌单用后的活性( $P < 0.05$ ),且这3个处理的几丁质酶活性均被抑制,分别较对照显著降低了14.8%、7.9%和6.8%( $P < 0.05$ ,表2)。

### 3 讨论

为响应绿色发展,本研究利用免疫抑制蛋白FKBP52和金龟子绿僵菌共同防治西花蓟马,FKBP52蛋白与金龟子绿僵菌联合使用第9天时,西花蓟马累计死亡率显著提升为81.11%,协同毒力指数为24.10,两者具有增效作用。田野等(2021)利用FKBP52蛋白和绿僵菌联合作用10 d后东亚飞蝗的死亡率达93.33%,FKBP52蛋白显著提升了绿僵菌对东亚飞蝗的致死率,与本研究结果一致。Richards et al.(2011)利用免疫抑制蛋白rVPr1和白僵菌共同防治甘蓝夜蛾,rVPr1显著提升了白僵菌对甘蓝夜蛾的致死率,与本研究结果一致。表明免疫抑制蛋白能促进绿僵菌的侵染,增加对寄主的致病力,提高对寄主的致死率。

通常情况下,昆虫摄入有害物质或感染病原真菌后,其体内相关解毒酶和保护酶的表达量和活性会显著升高,以协助清除有害物质,进而维持个体发

育和生存(Birnbaum et al., 2017)。本研究结果显示,与对照相比,金龟子绿僵菌与FKBP52蛋白联合使用1~3 d后西花蓟马体内几丁质酶活性表现为先激活后抑制。鄢杰明等(2012)发现多杀菌作用舞毒蛾 *Lymantria dispar* 3龄幼虫3~12 h后,其体内几丁质酶活性先升高后不变,当多杀菌作用于舞毒蛾5龄幼虫12~24 h后,其体内几丁质酶活性先不变后抑制,与本研究结果不一致,这可能与取样时间、虫龄和药剂作用机制不同有关。本研究结果显示金龟子绿僵菌与FKBP52蛋白联合使用1 d后,西花蓟马体内几丁质酶活性与绿僵菌单用的无显著差异;联合使用2 d后,其活性小于绿僵菌单用的;联合使用3 d后,其活性大于绿僵菌单用的,这可能是开始施用金龟子绿僵菌和FKBP52蛋白对西花蓟马毒力较低,随着毒力累计对西花蓟马机体造成严重威胁,迫使机体产生过度免疫防御反应,最终导致西花蓟马体内几丁质酶活性被激活。

本研究结果显示,与对照相比,金龟子绿僵菌和FKBP52蛋白联合使用1~3 d后西花蓟马体内CarE活性先降低后不变。龚佑辉等(2009)报道,球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 处理后,朱红毛斑蛾 *Phauda flammans* 幼虫体内CarE活性呈现先降低后升高的趋势,与本研究结果不一致,这可能与药剂不同有关;张文成等(2009)报道虫螨脲处理后,甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 幼虫体内CarE活性先抑制后激活,与本研究结果也不一致,这可能与取样时间和药剂作用机理不同有关。金龟子绿僵菌与FKBP52蛋白联合使用1 d后西花蓟马体内CarE活性显著小于金龟子绿僵菌单用的;联合使用2 d和3 d后,其活性均显著大于金龟子绿僵菌单用的,究其原因可能是FKBP52蛋白和金龟子绿僵菌联合使用后对西花蓟马免疫系统有更强的破坏力,所以施药后1 d时有显著抑制作用,随着毒力累计对西花蓟马机体造成严重威胁,迫使机体产生过度免疫防御反应,最后导致西花蓟马Care活性被激活。

本研究结果显示,与对照相比,金龟子绿僵菌与FKBP52蛋白联合使用1~3 d后西花蓟马体内PO活性先抑制后不变。李蕾(2021)研究发现,与对照和黄绿绿僵菌单用相比,反式茴香脑与黄绿绿僵菌 *Metarhizium flavoviride* 联合使用1~3 d后菜青虫 *Pieris rapae* 血淋巴PO活性一直处于激活状态,与本研究结果不一致,这可能与反式茴香脑和FKBP52蛋白的作用机理不同有关。方月等(2017)研究发现苦瓜素I对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*

幼虫体内PO活性有抑制作用,与本研究结果不一致,这可能与药剂不同有关。本研究结果显示,金龟子绿僵菌与FKBP52蛋白联合使用1 d后西花蓟马体内PO活性显著小于金龟子绿僵菌单用的;联合使用2 d后,其活性与金龟子绿僵菌单用的无显著差异;联合使用3 d后,其活性显著大于金龟子绿僵菌单用的,这可能是FKBP52蛋白和金龟子绿僵菌联合使用后对西花蓟马免疫系统有更强的破坏力,所以施用后1 d时有显著抑制作用,随着毒力累计对西花蓟马机体造成严重威胁,迫使机体产生过度免疫防御反应,最后导致PO活性被激活。

本研究结果显示,与对照相比,金龟子绿僵菌与FKBP52联合使用1~3 d后西花蓟马体内GST活性均无显著变化,但金龟子绿僵菌单用1~3 d后西花蓟马体内GST活性先升高后降低。余慧灵等(2015)发现溴氰虫酰胺亚致死剂量使甜菜夜蛾GST活性呈现先升高后降低的变化趋势,与本研究绿僵菌单用后西花蓟马体内GST活性变化一致,但是与金龟子绿僵菌与FKBP52蛋白联合使用后西花蓟马体内GST活性变化不一致,这可能是金龟子绿僵菌和FKBP52蛋白药效时间不同所造成的。张文成等(2009)报道,虫螨脒处理甜菜夜蛾幼虫6~24 h后,其体内GST活性处于激活状态,与本研究结果不一致,这可能与药剂的作用机理有关,虫螨脒是化学农药,见效快,这使得西花蓟马的生理反应更大,而金龟子绿僵菌与FKBP52是生物制剂,药效慢,西花蓟马的生理反应小一些。

此外,本研究结果还显示,各处理后西花蓟马体内CarE、GST、PO和几丁质酶活性被激活或者被抑制均与时间有关,同时金龟子绿僵菌与FKBP52蛋白的交互作用对西花蓟马体内几丁质酶、CarE和PO活性有叠加效应。本试验只研究了对西花蓟马少数解毒酶和几丁质酶活性的影响,昆虫体内还存在许多其他解毒酶和保护酶及消化酶系等,下一步加大研究深度和广度,进一步揭示FKBP52蛋白和金龟子绿僵菌的增效机理。

### 参 考 文 献 (References)

- Abd-El-Haliem AM, Hoogstrate SW, Schuurink RC. 2018. A robust functional genomics approach to identify effector genes required for thrips (*Frankliniella occidentalis*) reproductive performance on tomato leaf discs. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1852
- Birnbaum SSL, Rinker DC, Gerardo NM, Abbot P. 2017. Transcriptional profile and differential fitness in a specialist milkweed insect across host plants varying in toxicity. *Molecular Ecology*, 26(23): 6742–6761
- Fan ZF, Chen YP, Li BL, Gou DY, He SQ, Gui FR. 2022. Effects of flu-pyradifurone on the activities of protective and detoxifying enzymes in western flower thrips *Frankliniella occidentalis* under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Journal of Plant Protection*, 49(4): 1225–1232 (in Chinese) [樊宗芳, 陈亚平, 李碧兰, 勾德映, 和淑琪, 桂富荣. 2022. CO<sub>2</sub>浓度倍增下氟吡呋喃酮对西花蓟马保护酶和解毒酶活性的影响. *植物保护学报*, 49(4): 1225–1232]
- Fang Y, Zhu CY, Cao X, Guo ZJ, Ling B. 2017. Inhibition effects of momordicin I on phenoloxidase of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Environmental Entomology*, 39(5): 1105–1113 (in Chinese) [方月, 朱春亚, 曹溪, 郭子俊, 凌冰. 2017. 苦瓜素I对亚洲玉米螟幼虫酚氧化酶活性的抑制作用. *环境昆虫学报*, 39(5): 1105–1113]
- Federici BA, Bonning BC, St. Leger RJ. 2008. Improvement of insect pathogens as insecticides through genetic engineering.//Sleator R, Hill C. *Patho-biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, pp. 15–40
- Gao YL, Lei ZR, Reitz SR. 2012. Western flower thrips resistance to insecticides: detection, mechanisms and management strategies. *Pest Management Science*, 68(8): 1111–1121
- Geisler M, Bailly A. 2007. Tête-à-tête: the function of FKBP5s in plant development. *Trends in Plant Science*, 12(10): 465–473
- Gong YH, Wu QJ, Zhang YJ, Xu BY. 2009. Effect of sublethal concentration of spinosad on the activity of detoxifying enzymes in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 11(4): 427–433 (in Chinese) [龚佑辉, 吴青君, 张友军, 徐宝云. 2009. 亚致死浓度多杀菌素对西花蓟马解毒酶系活力的影响. *农药学报*, 11(4): 427–433]
- Harikishore A, Yoon HS. 2015. Immunophilins: structures, mechanisms and ligands. *Current Molecular Pharmacology*, 9(1): 37–47
- Harrar Y, Bellini C, Faure JD. 2001. FKBP5s: at the crossroads of folding and transduction. *Trends in Plant Science*, 6(9): 426–431
- Hou XL, Zhi JR, Hu X, Ye M. 2018. Effects of capsaicin on detoxification enzyme activity in adult female *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(2): 230–236 (in Chinese) [侯晓琳, 郅军锐, 胡雄, 叶茂. 2018. 辣椒素对西花蓟马雌成虫体内解毒酶活性的影响. *应用昆虫学报*, 55(2): 230–236]
- Huang P, Chen HX, Yao JA, Huang JC, Yu DY. 2019. Laboratory assessment of pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* against *Phenacoccus solani*. *Chinese Journal of Biological Control*, 35(6): 884–890 (in Chinese) [黄鹏, 陈汉鑫, 姚锦爱, 黄建成, 余德亿. 2019. 金龟子绿僵菌对石蒜绵粉蚧的室内毒力与防治效果. *中国生物防治学报*, 35(6): 884–890]
- Kassa A, Stephan D, Vidal S, Zimmermann G. 2004. Production and processing of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged conidia for locust and grasshopper control. *Mycological Research*, 108(1): 93–100

- Li Lei. 2021. Study on the cototoxicity and innate immunity mechanism of trans-anethole and *Metarhizium flavoviride* to *Pieris rapae*. Master thesis. Hefei: Anhui Agricultural University (in Chinese) [李蕾. 2021. 反式茴香脑与黄绿绿僵菌对菜青虫的联合毒力及免疫应答机制初探. 硕士学位论文. 合肥: 安徽农业大学]
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46: 667–702
- Ma Y, Liu RR, Ma ZQ, Zhang YL. 2010. Effects of cantharidin on four metabolizing enzymes and PPO in *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(8): 870–875 (in Chinese) [马燕, 刘瑞瑞, 马志卿, 张雅林. 2010. 斑蝥素对粘虫几种代谢酶及多酚氧化酶的影响. *昆虫学报*, 53(8): 870–875]
- Ma Y, Zhang WH. 2019. Safe measures for controlling main pests of Chinese wolfberry in Ningxia. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 65(7): 76–78 (in Chinese) [马莹, 张文华. 2019. 宁夏枸杞主要虫害安全防治技术措施. *陕西农业科学*, 65(7): 76–78]
- Richards EH, Bradish H, Dani MP, Pietravalle S, Lawson A. 2011. Recombinant immunosuppressive protein from *Pimpla hypochondrica* venom (rVPr<sub>1</sub>) increases the susceptibility of *Mamestra brassicae* larvae to the fungal biological control agent, *Beauveria bassiana*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 78(3): 119–131
- Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*, 4: 19
- Shen DR, He C, Liu J, Yuan SY, He SY, Zhang HR. 2015. Occurrence, harm and morphological variation of *Frankliniella occidentalis* in Yunnan. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 43(7): 121–123 (in Chinese) [沈登荣, 何超, 刘佳, 袁盛勇, 和绍禹, 张宏瑞. 2015. 西花蓟马在云南的发生危害及形态变异. *江苏农业科学*, 43(7): 121–123]
- Solassol J, Mange A, Maudelonde T. 2011. FKBP family proteins as promising new biomarkers for cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(4): 320–325
- St Leger RJ, Wang CS. 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4): 901–907
- Tian Y, Li BB, Li S, Nong XQ, Zhang ZH, Liu TH, Wang GJ. 2021. Effects of FK506-binding protein FKBP52 on *Metarhizium anisopliae* infesting *Locusta migratoria manilensis*. *Plant Protection*, 47(2): 37–45 (in Chinese) [田野, 李贝贝, 李霜, 农向群, 张泽华, 刘廷辉, 王广君. 2021. FK506结合蛋白FKBP52对金龟子绿僵菌侵染东亚飞蝗的影响. *植物保护*, 47(2): 37–45]
- Wan YR, He BQ, Yuan GD, Wei GS, Wu QJ. 2016. Development of resistance to spinosyns in populations of western flower thrips in Beijing and Yunnan. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(2): 396–402 (in Chinese) [万岩然, 何秉青, 苑广迪, 魏国树, 吴青君. 2016. 北京和云南地区西花蓟马对多杀菌素类药剂产生抗性. *应用昆虫学报*, 53(2): 396–402]
- Wang H, Li JX, Kang C, Qiao GX, He J. 2021. Field efficacy of biological insecticides against wolfberry thrips. *Agrochemicals*, 60(5): 368–370 (in Chinese) [王昊, 李锦馨, 康超, 乔改霞, 何嘉. 2021. 生物药剂对枸杞蓟马的田间药效试验. *农药*, 60(5): 368–370]
- Wang SY, Zhang AS, Li LL, Men XY, Zhou XH, Zhai YF, Liu YJ, Wei SJ, Yu Y. 2014. Insecticide resistance status of field populations of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in China and its control strategies. *Acta Entomologica Sinica*, 57(5): 621–630 (in Chinese) [王圣印, 张安盛, 李丽莉, 门兴元, 周仙红, 翟一凡, 刘永杰, 魏书军, 于毅. 2014. 西花蓟马田间种群对常用杀虫剂的抗性现状及防治对策. *昆虫学报*, 57(5): 621–630]
- Yan JM, Yan SC, Cao CW. 2012. Effects of spinosad on the activity of protective enzymes and chitinase in *Lymantria dispar*. *Journal of Beijing Forestry University*, 34(1): 80–85 (in Chinese) [鄢杰明, 严善春, 曹传旺. 2012. 多杀菌素对舞毒蛾保护酶及几丁质酶的影响. *北京林业大学学报*, 34(1): 80–85]
- Yu HL, Xiang X, Yuan GX, Chen YQ, Wang XG. 2015. Effects of sublethal doses of cyantraniliprole on the growth and development and the activities of detoxifying enzymes in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(6): 634–641 (in Chinese) [余慧灵, 向兴, 袁贵鑫, 陈羿渠, 王学贵. 2015. 溴氰虫酰胺亚致死剂量对甜菜夜蛾生长发育及体内解毒酶活性的影响. *昆虫学报*, 58(6): 634–641]
- Zhang JN, Zhao J. 2018. SWOT analysis and the development strategy of Chinese wolfberry industry in Ningxia. *China-Arab States Science and Technology Forum*, (4): 21–25, 105–111 (in Chinese) [张俊宁, 赵洁. 2018. 宁夏枸杞产业的SWOT分析与发展策略. *中阿科技论坛*, (4): 21–25, 105–111]
- Zhang WC, Wang KY, Niu F, Wang D, Ren XX. 2009. Induction of chlorfenapyr on endogenous protective and detoxifying enzymes in beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Journal of Plant Protection*, 36(5): 455–460 (in Chinese) [张文成, 王开运, 牛芳, 王东, 任学祥. 2009. 虫螨腈胁迫对甜菜夜蛾保护酶系和解毒酶系的诱导效应. *植物保护学报*, 36(5): 455–460]
- Zhou LL, Si SY, Wang ZX, Wang Y, Liu XM. 2009. Biochemical mechanisms of beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to tebufenozide. *Acta Entomologica Sinica*, 52(4): 386–394 (in Chinese) [周利琳, 司升云, 汪钟信, 望勇, 刘小明. 2009. 甜菜夜蛾对虫酰肼抗性的生化机制. *昆虫学报*, 52(4): 386–394]
- Zhu J. 2009. Identification of the diapause-associated genes *Esr16* and *FKBP12* in *Helicoverpa armigera*. Master thesis. Hefei: University of Science and Technology of China (in Chinese) [朱佳. 2009. 棉铃虫滞育相关基因蜕皮激素调节蛋白和FK506结合蛋白的研究. 硕士学位论文. 合肥: 中国科学技术大学]

(责任编辑:张俊芳)