

阿维菌素和高效氯氰菊酯亚致死剂量对小菜蛾 谷胱甘肽 S - 转移酶的影响

梁沛 夏冰 石泰 高希武

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100094)

摘要 研究了阿维菌素和高效氯氰菊酯亚致死剂量对小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 谷胱甘肽 S - 转移酶 (GSTs) 活性的影响。用亚致死剂量的阿维菌素和高效氯氰菊酯处理小菜蛾敏感品系后,二处理组的 GSTs 活性比对照组分别增长了 42% 和 70%;抗性品系经上述 2 种药剂同样处理后的活性比对照分别降低了 45% 和 30%。对 GSTs 的动力学研究表明,敏感品系用高效氯氰菊酯处理后 GSTs 的 K_m 值比对照降低了近 40%,而阿维菌素处理后其 K_m 值变化不大,说明高效氯氰菊酯处理后,GSTs 对底物的亲和力明显增强;抗性品系中二处理组 GSTs 的 K_m 值与对照无显著差异。

关键词 小菜蛾;亚致死剂量;阿维菌素;高效氯氰菊酯;谷胱甘肽 S - 转移酶

中图分类号 Q 965.9

文章编号 1007-4333(2003)03-0065-04

文献标识码 A

Effect of sublethal doses of abamectin and γ -cypermethrin on glutathione S - transferases in diamondback moth *Plutella xylostella* (L.)

Liang Pei, Xia Bing, Shi Tai, Gao Xiwu

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The treatment of the sublethal doses of abamectin (AVM) and γ -cypermethrin (CPM) increased the specific activities of glutathione S - transferases (GSTs) in the susceptible strain (XH - S) of diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.) by 42% and 70%, respectively. However, the GSTs activities decreased by 45% and 30%, respectively, in the abamectin - resistant strain AV - R with the same treatments. On the kinetic study, we found that with the treatments of AVM and CPM, the affinity of GSTs to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at their sublethal concentrations was varied. The K_m (Michaelis-Menten constant) value of GSTs decreased by about 40% in XH - S strain treated with CPM compared with that of the control, but there was no significant change in the case of AVM treatment. Moreover significant differences of the K_m values were not observed in the AV - R strain with or without the treatment of AVM and CPM.

Key words *Plutella xylostella* (L.); sublethal dose; abamectin; γ -cypermethrin; glutathione S - transferase

小菜蛾一直是农田和保护地蔬菜生产中最难防治的害虫之一,目前仍以化学防治为主。杀虫剂施于田间可直接杀死大部分害虫,但由于害虫不同个体间接触药量的差异以及药剂的部分降解,对害虫及天敌还有一定的亚致死效应。近年来,随着环保意识的增强,人们在杀虫剂对昆虫的亚致死效应方面做了很多工作,包括对害虫及其天敌的生物学、生态行为和生殖力等多方面的影响^[1~3]。

亚致死剂量的杀虫剂对于害虫的抗药性发展有促进作用。高宗仁等^[3]用 4 种类型杀虫剂的亚致死剂量对朱砂叶螨 (*Tetranychus cinnabarinus*) 连续选

择 3 代,发现其对这 4 种药剂的敏感度均有不同程度的下降,且各发育阶段的历期也有不同程度的缩短。Nandihalli 等^[4]发现溴氰菊酯等 3 种菊酯类药剂的亚致死剂量比推荐使用浓度引起的棉蚜再猖獗现象更为严重。现缺乏更深入研究杀虫剂亚致死剂量处理对昆虫解毒酶的影响,仅见个别报道^[5~7]。

本文在生化水平对阿维菌素和高效氯氰菊酯亚致死浓度处理小菜蛾谷胱甘肽 S - 转移酶 (GSTs) 的活性变化进行了研究,为深入研究小菜蛾的抗药性发展机制及其有效治理提供理论依据。

收稿日期:2002-12-30

基金项目:国家重大基础研究 973 资助项目(TG2000016207);国家自然科学基金资助项目(29832025 和 39970496)

作者简介:梁沛,讲师;高希武,教授,联系作者,主要从事昆虫毒理学研究,E-mail:gaoxiwu@263.net.cn

1 材料与方法

1.1 试虫来源及饲养

阿维菌素抗性品系(AV-R)由1997年采自河北省宣化田间的宣化种群室内汰选得到,阿维菌素敏感品系(XH-S)由同源的宣化种群在不接触药剂情况下同步饲养得到。室内饲养采用蛭石萝卜苗法^[8]。

1.2 供试试剂、药剂及仪器

91.2%阿维菌素(abamectin)原药(北京农业大学新技术开发总公司提供);5%高效氯氰菊酯(*-cypermethrin*)乳油(山东中石化化工有限公司产品);1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)和还原型谷胱甘肽(GSH)(Sigma公司产品);曲拉通(Triton X-100)(上海化学试剂采购供应站美国进口分装)。

1.3 生物测定

参照Ismail和Wright^[9]叶片药膜法,取新鲜无农药污染的甘蓝叶片浸在系列浓度的药液中10s,以蒸馏水(含0.01% Triton X-100)作对照,室内晾干后接大小一致的3龄幼虫(2~3mg/头),每个浓度重复3次,每个重复接10~20头幼虫。48h后统计死亡率。数据用POLO软件处理,计算LC₅₀值及毒力回归方程的斜率(*b*)。

1.4 谷胱甘肽S-转移酶GSTs活性测定

1.4.1 试虫处理 参照1.3方法,取新鲜无农药污染的甘蓝叶片分别在亚致死剂量(表1)的阿维菌素和高效氯氰菊酯溶液中浸10s,室内晾干,置于5个培养皿中,接种幼虫同上。24h后将存活的幼虫于-20℃冻存。以蒸馏水处理叶片为对照。

1.4.2 谷胱甘肽S-转移酶活性测定 将上述处理过的幼虫(50~70头)去头后,加pH6.5的0.04mol L⁻¹的磷酸缓冲液匀浆,制备的酶液冰浴备用。GSTs活性测定参考张常忠等^[10]方法。

1.4.3 米氏常数(K_m)的测定 采用双倒数做图法^[11]。

1.4.4 蛋白质含量测定 参照Bradford考马斯亮蓝G250法^[12]。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾对阿维菌素和高效氯氰菊酯抗性水平的测定

从小菜蛾敏感品系和抗性品系对阿维菌素和高效氯氰菊酯的敏感度(表1)进一步得到阿维菌素和高效氯氰菊酯分别对小菜蛾敏感品系和抗性品系的亚致死浓度LC₁₇。

表1 小菜蛾幼虫对阿维菌素和高效氯氰菊酯的敏感度测定

Table 1 The toxicity of abamectin and *-cypermethrin* to larvae of diamondback moth

小菜蛾品系	杀虫剂	斜率 <i>b</i>	LC ₅₀ /(mg L ⁻¹)	95%置信限/(mg L ⁻¹)	LC ₁₇ /(mg L ⁻¹)
XH-S	阿维菌素	1.104 ± 0.290	0.032	0.012 ~ 0.063	0.011
	高效氯氰菊酯	1.960 ± 0.312	179.375	124.934 ~ 244.408	59.792
AV-R	阿维菌素	1.478 ± 0.293	9.765	6.423 ~ 13.884	3.255
	高效氯氰菊酯	2.398 ± 0.552	940.208	486.926 ~ 1319.641	313.403

注:表中斜率表示 $X \pm SD$ 。

2.2 小菜蛾幼虫谷胱甘肽S-转移酶的性质

2.2.1 小菜蛾幼虫谷胱甘肽S-转移酶活性比较

用亚致死浓度的阿维菌素和高效氯氰菊酯处理小菜蛾敏感品系后,二处理组的GSTs活性比对照组分别增长了42%和70%。方差分析表明三者在此 = 0.01水平上差异显著。抗性品系用上述两种药剂作同样处理后其活性均低于对照,分别降低了45%和30%,且三者在此 = 0.01水平上差异显著。抗性品系对照的活性与敏感品系的相差不大(表2)。

2.2.2 小菜蛾幼虫GSTs对底物亲和力的变化

敏感品系用高效氯氰菊酯处理后,其GSTs的K_m值明显低于对照,而阿维菌素处理后其K_m值变化不大(表3),说明高效氯氰菊酯处理后GSTs对底物

表2 亚致死浓度的阿维菌素和高效氯氰菊酯处理小菜蛾抗性和敏感品系幼虫GSTs活性变化

Table 2 Changes of larvae specific activities of GSTs in resistant and susceptible diamondback moth strains treated with sublethal concentrations of abamectin or *-cypermethrin*

小菜蛾品系	处理	比活力/ OD ₃₄₀ · (mg · min) ⁻¹	RR
XH-S	对照	2.244 ± 0.042 A	1.000
	阿维菌素	3.188 ± 0.015 B	1.420
	高效氯氰菊酯	4.025 ± 0.110 C	1.793
AV-R	对照	2.093 ± 0.051 A	1.000
	阿维菌素	1.143 ± 0.018 B	0.546
	高效氯氰菊酯	1.470 ± 0.043 C	0.702

注:比活力表示 $X \pm SD$, RR = 处理组比活力/对照组比活力,数字后的字母不同表示 $P < 0.01$ 。

的亲和力增强,二处理的 V_{\max} 均显著高于对照,说明其活性与对照相比明显升高。抗性品系二处理的

K_m 值与对照差异不大,而 V_{\max} 均低于对照,说明其活性与对照相比均有所降低。

表 3 亚致死浓度的阿维菌素和高效氯氟菊酯处理抗性和敏感品系小菜蛾幼虫 GSTs 的 K_m 和 V_{\max} 值变化

Table 3 Changes of the K_m and V_{\max} values of larvae GSTs in resistant and susceptible DBM strains treated with sublethal concentrations of abamectin or γ -cypermethrin

小菜蛾品系	处 理	$K_m / (10^{-4} \text{ mol L}^{-1})$	RR	$V_{\max} / \text{OD}_{340} \cdot (\text{mg min})^{-1}$	RR
XH - S	对照	6.521 \pm 1.603 a	1.000	3.773 \pm 0.388 a	1.000
	阿维菌素	5.658 \pm 0.068 a	0.868	5.107 \pm 0.018 b	1.354
	高效氯氟菊酯	3.902 \pm 0.607 b	0.598	5.748 \pm 0.330 c	1.523
AV - R	对照	1.288 \pm 0.415 a	1.000	2.183 \pm 0.213 a	1.000
	阿维菌素	1.396 \pm 0.445 a	1.084	1.219 \pm 0.122 b	0.558
	高效氯氟菊酯	1.279 \pm 0.548 a	0.993	1.521 \pm 0.197 b	0.697

注:表中比活力表示 $X \pm SD$, RR = 处理组比活力/对照组比活力,数字后的字母不同表示 $P < 0.05$ 。

3 结论与讨论

上述结果表明,用亚致死浓度 (LC_{17}) 的阿维菌素和高效氯氟菊酯处理对小菜蛾敏感品系的 GSTs 活性有一定的诱导作用,而对抗性品系的 GSTs 活性有一定抑制作用。这与夏冰等^[7]用亚致死浓度的阿维菌素和高效氯氟菊酯处理后小菜蛾羧酸酯酶活性的变化相似,表明亚致死浓度的阿维菌素和高效氯氟菊酯对小菜蛾 GSTs 和羧酸酯酶这两种解毒酶的影响是一致的。Rumpf^[5]用氯氟菊酯亚致死剂量处理褐蛉 *Mcromus tasmaniae* 幼虫后,也发现其 GSTs 活性明显增加,而用苯氧威亚致死剂量处理后 GSTs 活性却明显降低。高希武等^[13]用 LD_5 剂量的对硫磷处理 3 龄棉铃虫幼虫 24 h 后,发现 GSTs 活性与对照组没有显著差异,而灭多威处理组的 GSTs 活性则下降了 78%。表明亚致死剂量的不同杀虫药剂对不同昆虫的 GSTs 活性的影响可能存在差异。

对 GSTs 动力学研究表明,敏感品系用高效氯氟菊酯处理后 GSTs 的 K_m 值对照相比降低了近 40%,而阿维菌素处理后 K_m 值变化不大,说明高效氯氟菊酯处理后 GSTs 对底物的亲和力明显增强, V_{\max} 值也表明二处理组 GSTs 的活性均高于对照。抗性品系中二处理组 GSTs 的 K_m 值与对照无显著差异,说明不同处理对小菜蛾 GSTs 与底物的亲和力影响不大。研究还发现抗性品系对照组的 K_m 值也明显低于敏感品系的对照组,这说明用阿维菌素长期汰选可使小菜蛾 GSTs 对阿维菌素的亲和力增强,使其解毒能力相应增强。

关于杀虫剂对害虫的亚致死效应,过去多以群

体的死亡率、繁殖率、及生态行为学等方面的参数来评价和评估^[14,15],从更深层次的酶动力学及分子水平上对亚致死效应进行的研究国内外还不是很多。深入研究农药在生态系统中的深远影响,探讨亚致死效应的生化、分子机制,对于合理使用杀虫剂、减少其不良副作用、协调生物防治和化学防治的关系将具有积极意义,是农药及昆虫毒力学的一个重要发展方向。

参 考 文 献

- [1] Perveen F. Sublethal effects of chlorfluzuron on reproductivity and viability of *Spodoptera litura* (F.) (Lep., Noctuidae) [J]. J Appl Entomol, 2000, 124: 5 ~ 6, 223 ~ 231
- [2] Elzen G W. Lethal and sublethal effects of insecticide residues on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthrenidae) and *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) [J]. J Econ Entomol, 2001, 94(1): 55 ~ 59
- [3] 高宗仁,李巧丝,刘孝纯. 杀虫剂对朱砂叶螨某些生物学特性的影响[J]. 植物保护学报, 1991, 18(3): 283 ~ 287
- [4] Nandihalli B S, Patil B V, Hugar P. Influence of synthetic pyrethroid usage on aphid resurgence in cotton. Karnataka [J]. Agri Sci, 1992, 5(3): 234 ~ 237
- [5] Rumpf S, Hetzel F, Frampton C. Lacewings (Neuroptera: Hemerobiidae and Chrysopidae) and integrated pest management: enzyme activity as biomarker of sublethal insecticide exposure [J]. J Econ Entomol, 1997, 90(1): 102 ~ 108
- [6] 高希武,董向丽,郑炳宗,等. 棉铃虫的谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST): 杀虫剂和植物次生性物质的诱导与 GST 对杀虫药剂的代谢 [J]. 昆虫学报, 1997, 40(2): 122 ~ 125
- [7] 夏冰,石泰,梁沛,等. 杀虫剂亚致死剂量对小菜蛾羧

- 酸酯酶的影响 [J]. 农药学学报, 2002, 4(1): 23 ~ 27
- [8] 刘传秀, 韩招久, 李凤良, 等. 应用蛭石萝卜苗法室内继带大量繁殖小菜蛾的研究 [J]. 昆虫知识, 1993, 30(6): 341 ~ 344
- [9] Ismail F, Wright D J. Synergism of teflubenzuron and chlorfluazuron in an acylurea-resistant field strain of *Plutella xylostella* (L). (Lepidoptera: Yponomeutidae) [J]. Pestic Sci, 1992, 34: 221 ~ 226
- [10] 张常忠, 高希武, 郑炳宗. 棉铃虫谷胱甘肽-S 转移酶的活性分布和发育期变化及植物次生物质的诱导作用 [J]. 农药学学报, 2001, 3(1): 30 ~ 35
- [11] 袁勤生 主编. 现代酶学 [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001. 22 ~ 23
- [12] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding [J]. Analyt Biochem, 72: 248 ~ 254
- [13] 高希武, 赵颖, 王旭, 等. 杀虫药剂和植物次生物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用 [J]. 昆虫学报, 1998, 41(增刊): 5 ~ 10
- [14] Nauen R, Koob B, Elbert A. Antifeedant effects of sublethal dosages of imidacloprid on *Bemisia tabaci* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1998, 88(3): 287 ~ 293
- [15] 徐学农, 王刚, 高仕朋. 杀螨王的亚致死浓度处理桃叶对山楂叶雌成螨生殖的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(4): 352 ~ 355

科研简讯

“猪高产仔数 *FSH* 基因发现及其应用研究”

该项目通过教育部主持的技术鉴定。该项成果是在国家自然科学基金重点项目“太湖猪高繁殖力的分子遗传基础研究”和国家 973 项目“动物遗传育种与克隆的分子生物学基础研究”资助下, 由中国农业大学生物技术国家重点实验室李宁教授主持, 从遗传学和分子生物学角度研究了我国优良地方猪种高产仔数的分子机理。该技术已获国际专利。

“大豆胰蛋白酶抑制因子单克隆抗体的制备及其检测试剂盒的研制”

该项目是我校农业部饲料工业中心李德发教授和谯仕彦教授共同主持完成的国家“十五”科技攻关项目。该项目 2003 年通过教育部组织的鉴定。

目前世界上的畜禽饲料主要用玉米豆粕配合型饲料, 豆粕的产量占世界饼粕类产品生产总量的 2/3 及出口总量的 68%。2001 年世界豆粕进出口量均超过 4 000 万 t。但是由于加工水平和豆粕质量的较大差异对饲料质量造成相当大的影响, 因此对豆粕质量的检测就十分重要。

通过检测大豆中的主要抗营养因子“大豆胰蛋白酶抑制因子”判断饲料的蛋白含量是一种十分有效的检测手段, 而目前食品工业及饲料厂只能用尿酶活性来间接表示。但因为酶化学检测方法步骤繁琐, 每次检样量少, 结果差异性大, 效果不理想。该课题研制成功的大豆胰蛋白酶抑制因子单克隆抗体试剂盒检测法具有快速、简便的特点, 解决了目前的检测难题, 可以应用于大豆、豆饼、豆粕等饲料原料的蛋白质检测。

“培养雨生红球藻生产天然虾青素”研究

该项目是我校农业部饲料工业中心李德发教授等主持的国家“十五”科技攻关项目, 近日通过了教育部的成果鉴定, 这一成果使我国生产天然虾青素技术取得重要突破。

天然虾青素是一种优质、高效、安全的着色剂和天然抗氧化剂, 能提高动物的免疫力和存活率, 增加动物产品的营养价值和外观色泽。国外已有天然虾青素的工业化生产, 但我国天然虾青素尚未形成生产规模。

课题组选择了已知的自然界中虾青素含量最高的雨生红球藻来生产虾青素, 运用微藻生物学、微生物学和动物营养学的研究技术, 研究了整个技术环节, 建立了准确、快速的虾青素含量高效液相色谱检测方法。结果表明, 该产品对肉鸡的生产性能无显著影响, 但有提高全期饲料转化效率的趋势, 还可以提高胸肌的色度、降低亮度从而改善鸡肉品质。

(科技处供稿)