

棉铃虫抗药性的生理生化机制研究*

张友军

张文吉 韩熹莱 李学锋

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081) (中国农业大学应用化学系 北京 100094)

摘要 本文报道了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 田间抗性种群对杀虫剂抗药性的生理生化机制。抗性种群(HJ-R)5龄幼虫羧酸酯酶、谷胱甘肽转移酶、多功能氧化酶活力均明显高于相对敏感种群(HD-S)。两种群乙酰胆碱酯酶对杀虫剂敏感性没有显著差异。HJ-R种群的腹神经索对氰戊菊酯表现了2~3倍的神经不敏感性。HJ-R种群对氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性主要是由代谢机制引起,其中多功能氧化酶可能起主导作用;对菊酯的抗性是由多功能氧化酶、酯酶、以及神经不敏感性几个因子综合作用的结果。

关键词 棉铃虫, 多功能氧化酶, 酯酶, 谷胱甘肽转移酶, 神经不敏感性

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是一种重要的农业害虫,广泛分布在南纬40°到北纬40°之间。为害棉花、玉米、小麦、蔬菜等多种农作物。近年来由于田间棉铃虫种群对多种杀虫剂产生了抗药性,原有化学农药防治效果显著降低,棉铃虫持续偏重发生。已给我国的农业生产、国民经济造成了巨大的损失。延缓、克服棉铃虫抗药性是当前保证棉花稳产、高产的重要条件。抗性机制的研究是害虫抗性治理工作的基础,明确抗性机制后,对于选择快速准确的抗性监测方法,指导田间合理使用农药,制定科学的抗性治理策略等均有重要的指导意义。

国外棉铃虫抗性研究表明,棉铃虫对菊酯杀虫剂抗性机制包括神经敏感性降低、表皮穿透减少、多功能氧化酶代谢以及酯酶代谢增强^[1~3]。但抗性的产生与用药历史背景密切相关,抗性机制具有明显的地域特点。国内棉铃虫抗性机制研究起步较晚,除使用增效剂间接证明了多功能氧化酶代谢在对菊酯抗性中的作用外^[4],对棉铃虫抗药性的其它生理生化机制仍缺少全面系统的研究,特别是对有机磷、氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性机制,国内还没有这方面的报道。

1 材料与方法

1.1 实验昆虫

相对敏感种群(HD-S):于1988年采自河北省邯郸市,于室内以人工饲料饲养,未再经任何药剂汰选。由于该种群采自田间,对几种杀虫剂均表现了一定的异质性(表1),故HD-S只能作为参考敏感种群。

* 国家“八五”攻关和国家教委博士点基金资助
1995-07-13收稿,1996-06-10收修改稿

抗性种群 (HJ-R): 于1994年采自河北省河间市棉区, 该地有多年棉花栽培历史, 用药量较大。试虫采后于室内饲养, 未再经药剂汰选。

1.2 供试药剂

氰戊菊酯 (fenvalerate): 80%原油, 北京农业大学实验药厂; 99.4%, 日本住友株式会社, 用于神经电生理实验。

甲基对硫磷 (parathion-methyl): 71.5%原油, 山东宁阳农药厂。灭多威 (methomyl): 82.4%原粉, 山东济宁化工厂。

1.3 生物测定

将药剂溶于丙酮, 配成系列浓度, 用0.0636 μL 的点滴器滴在3龄幼虫 (7~14 mg) 前胸背部。以丙酮为对照, 点药后, 饲以人工饲料, 于 (26 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下饲养, 48 h 检查结果, 所得结果以机率值分析软件处理。

1.4 代谢酶系研究

棉铃虫5龄幼虫 (350~400 mg) 按2.5 mL/头 (未去掉中肠内容物) 于冰冷的蒸馏水中匀浆, 将匀浆液10 000 g, 0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min, 上清液用作酶源。

羧酸酯酶测定参照 Asperen van^[5]方法, 酶液稀释10倍, 取酶液10 μL , 加3 mL 磷酸缓冲液 (4 \times 10⁻² mol/L pH 7.8) 稀释的含5 \times 10⁻⁷ mol/L 毒扁豆碱的乙酸 α -萘酯 (4 \times 10⁻⁴ mol/L) 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应30 min。加0.5 mL 显色液, 于754紫外可见分光光度计600 nm 比色。以不加毒扁豆碱的底物溶液测定全酯酶活力。

谷胱甘肽转移酶测定参照 Clark 等^[6]方法, 反应体系中, 还原性谷胱甘肽 (GSH) 与1-氯2, 4-二硝基苯 (CDNB) 均为1 mmol/L, 0.1 mL 酶液, 0.1 mol/L pH 6.5磷酸缓冲液, 反应总体积3 mL, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应5 min, 于340 nm 处比色。

多功能氧化酶活性测定参照 Shang Chih-chen 等^[7]方法, 解剖5龄幼虫中肠, 于1.15% KCl 溶液中漂洗, 按3头中肠/mL 加0.1 mol/L pH 7.8的磷酸缓冲液, 匀浆液经玻璃棉过滤后, 10 000 g, 0 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min (以上各步操作均控制在4 $^{\circ}\text{C}$ 以下进行), 上清液用作酶源。反应体系中含 NADPH 2.5 mg, 1 mL 缓冲液, 1 mL 酶液, 10 μL 0.1 mol/L 的甲基茴香醚, 于25 mL 磨口烧瓶内, 28 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min, 1 mL 1 mol/L 的 HCl 终止反应。5 mL 氯仿萃取, 取3.3 mL 氯仿层, 加入3 mL 0.5 mol/L NaOH, 取 NaOH 层于400 nm 处比色。

蛋白质含量测定采用考马氏亮兰染色法^[8], 以 BSA 作标准曲线。

1.5 乙酰胆碱酯酶研究

4龄幼虫 (50 mg/头~65 mg/头) 按1头/mL 匀浆 (匀浆液含0.001%的 Triton-X100), 10 000 g, 0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min, 上清液用作酶源。按 Gorun^[9]方法测定乙酰胆碱酯酶活性。测定6个不同底物浓度的酶反应初速度, 用 Lineweaver-burk 作图法^[10]求出乙酰胆碱酯酶米氏常数 (K_m)。将酶与氧化乐果在25 $^{\circ}\text{C}$ 保温, 按一定时间间隔 (最长时间

小于9 min), 取出一定保温液, 测定残余酶活力。按照 Main 等^[11]方法计算双分子速率常数 (K_i)。

1.6 神经电生理研究

参照刘安西^[12]方法, 游离棉铃虫5龄幼虫腹神经索, 将其转移到有4个小槽的神经小室中, 小室间以甘露醇分隔, 整个腹神经索横穿4个小槽, 浸在甘露醇和生理液^[13]中, 第二和第三小槽用来盛装生理液(处理前)或含氰戊菊酯的生理液(处理后)。腹神经索的自发发放活动通过第1、第4小槽的记录电极导出。经直流前置放大器(F2G-1A)、示波器(SBR-1)、磁带记录机(TEAC R80)记录在磁带上(SONY-EF60)。信号经电生理信号分析软件(北京大学生理及生物物理系制)处理, 以神经兴奋时间^[3]、神经传导阻断时间比较两种群对杀虫剂的神经电生理反应。

2 结果与分析

2.1 生物测定

HJ-R 种群相对于HD-S 种群对氰戊菊酯、甲基对硫磷、灭多威各表现了14.13、1.66、5.79倍的抗性(表1)。

表1 杀虫剂对棉铃虫3龄幼虫毒力测定结果

药剂	种群	试虫数	b	r	LD ₅₀ ($\mu\text{g/g}$) (95%置信限)	R/S
氰戊菊酯	HD-S	180	1.76±0.09	0.9912	3.25 (2.87~3.61)	
	HJ-R	180	2.17±0.17	0.9908	45.9 (40.63~51.54)	14.13
甲基对硫磷	HD-S	180	1.84±0.13	0.9659	4.12 (3.29~4.95)	
	HJ-R	180	2.39±0.25	0.9625	6.85 (6.12~7.57)	1.67
灭多威	HD-S	180	0.56±0.06	0.9640	4.25 (3.21~5.28)	
	HJ-R	180	1.00±0.07	0.9718	24.6 (19.35~29.85)	5.79

2.2 代谢酶系活力

从表2可以看出, HJ-R 种群羧酸酯酶和全酯酶活力均显著地大于HD-S 种群。以每毫克蛋白表示时, 两种群羧酸酯酶和全酯酶比值为1.90、1.92; 以每头幼虫所含酶量表示时, 种群间比值略有升高, 分别为2.06、2.08。同一种群棉铃虫羧酸酯酶与全酯酶的酶活相差不大, 表明棉铃虫水解乙酸 α -萘酯主要是羧酸酯酶, 而乙酰胆碱酯酶等其它水解酶对底物水解较少。

表2 棉铃虫 HJ-R 与 HD-S 两种群5龄幼虫羧酸酯酶和全酯酶活力

种群	羧酸酯酶 ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot30\text{ min})$)				全酯酶 ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot30\text{ min})$)			
	毫克蛋白	R/S	每虫	R/S	毫克蛋白	R/S	每虫	R/S
HD-S	5.69±0.17		85.91±3.56		6.19±0.26		88.9±2.63	
HJ-R	10.82±0.68	1.9*	162.9±10.27	2.1*	11.88±0.55	1.9*	178.8±8.36	2.1*

注: 表中实验结果均为4次实验的平均数; *表示差异显著 ($P<0.05$)。下同

两种群谷胱甘肽转移酶酶活相比(表3),HJ-R 种群明显高于 HD-S 种群。以每毫克蛋白或以每头幼虫表示酶活时,种群间比值为1.43、1.45。

HJ-R 种群多功能氧化酶活力也明显高于 HD-S 种群(表3),以每毫克蛋白或以每头幼虫表示酶活时,HJ-R 相对 HD-S 增加了1.45倍和1.69倍。

表3 棉铃虫 HJ-R 与 HD-S 两种群5龄幼虫谷胱甘肽转移酶和多功能氧化酶活性

种群	谷胱甘肽转移酶($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot 5\text{ min})$)				多功能氧化酶($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot 30\text{ min})$)			
	毫克蛋白	R/S	每虫	R/S	毫克蛋白	R/S	每中肠	R/S
HD-S	0.78 \pm 0.09		10.65 \pm 0.50		(10.92 \pm 1.70) 10^{-3}		(31.43 \pm 6.43) 10^{-3}	
HJ-R	1.10 \pm 0.11	1.43*	16.49 \pm 0.34	1.45*	(15.88 \pm 1.29) 10^{-3}	1.5*	(53.12 \pm 8.31) 10^{-3}	1.7*

上述三种代谢酶系,以每头幼虫表示酶活时,两种群间比值均略大于以每毫克蛋白表示酶活时的比值,由此可见两种群间除酶的特殊活力存在差异外,HJ-R 抗性种群幼虫体内可能还含有更多的酶蛋白。

2.3 乙酰胆碱酯酶

乙酰胆碱酯酶是有机磷、氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标,乙酰胆碱酯酶的变异可以导致杀虫剂对其抑制作用减弱, K_m 和 K_i 值是乙酰胆碱酯酶的两个特征常数, K_m 越大, K_i 值越小表示酶对底物亲和力越低,或对杀虫剂的抑制作用越不敏感。从表4可以看出,HD-S 和 HJ-R 两种群乙酰胆碱酯酶对杀虫剂的敏感性没有明显差异,种群间 K_m 和 K_i 比值(R/S)为1.01和0.91。乙酰胆碱酯酶活力 HJ-R 种群略高于 HD-S,比值为1.44。

表4 棉铃虫 HJ-R 与 HD-S 两种群4龄幼虫乙酰胆碱酯酶活力及米氏常数 (K_m)、双分子速率常数 (K_i)

种群	乙酰胆碱酯酶活力		K_m		K_i	
	$\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot \text{mg}\cdot 5\text{ min})$	R/S	(mmol/L)	R/S	$[\text{mol}/(\text{L}\cdot \text{min})]^{-1}$	R/S
HD-S	8.78 \pm 1.80		17.02 \pm 1.85		(0.34 \pm 0.06) 10^{-3}	
HJ-R	12.69 \pm 3.4	1.44	17.25 \pm 1.87	1.01	(0.31 \pm 0.09) 10^{-3}	0.91

2.4 神经电生理测定

离体的棉铃虫腹神经索对 10^{-5} mol/L 的氰戊菊酯作用十分敏感(表5),加入药剂不久,腹神经索的自发发放频率明显改变,其变化趋势可以区分为频率增大、恢复到自发状态(兴奋时间^[2])、传导阻断3个阶段。HJ-R 种群兴奋时间和神经传导阻断时间分别为8.29 min、12.71 min;HD-S 分别为3.2 min、5.4 min。兴奋时间、传导阻断时间两者比

表5 棉铃虫不同种群对菊酯作用的神经电生理反应

药剂浓度 (10^{-5} mol/L)	种群	试虫数	兴奋时间		传导阻断时间	
			平均 (min) \pm SD	R/S	平均 (min) \pm SD	R/S
氰戊菊酯	HJ-R	10	8.28 \pm 5.32	2.59*	12.71 \pm 6.78	2.35*
	HD-S	10	3.20 \pm 1.64		5.40 \pm 2.50	

值分别为2.59和2.35。

3 讨论

HJ-R 种群相对 HD-S 种群, 对拟除虫菊酯、氨基甲酸酯杀虫剂产生了中等水平的抗性, 对有机磷杀虫剂的敏感性也有所降低, 这与近几年田间用药情况是一致的。近年来, 田间棉铃虫防治曾大量使用菊酯(如溴氰菊酯、氰戊菊酯等)和氨基甲酸酯类(如灭多威)杀虫剂, 而有机磷杀虫剂使用量相对减少, 不同的选择压及不同药剂对棉铃虫抗性发展的作用不同, 导致了棉铃虫对几类杀虫剂不同的抗性水平。

HJ-R 种群是个多抗种群, 代谢酶系的研究也体现了这一点。HJ-R 种群多功能氧化酶、酯酶、谷胱甘肽转移酶活力均明显高于 HD-S 种群。多功能氧化酶能代谢几乎所有的杀虫剂, 谷胱甘肽转移酶使有机磷杀虫剂发生脱甲基作用, 酯酶对拟除虫菊酯、有机磷酸酯甚至氨基甲酸酯杀虫剂的酯键均能产生水解。HJ-R 种群较高的代谢酶活力, 必然伴随其对杀虫剂较强的解毒能力。

Gunning 等^[14]增效试验发现, 澳大利亚的棉铃虫种群对氨基甲酸酯杀虫剂的抗性与多功能氧化酶、酯酶的代谢有关, 而与乙酰胆碱酯酶变异关系不大。本实验生化测定的结果也表明 HJ-R 与 HD-S 两种群乙酰胆碱酯酶对杀虫剂的敏感性没有明显差异。HJ-R 种群对氨基甲酸酯、有机磷杀虫剂的抗性很可能是由代谢酶系的作用引起。由于酯酶对氨基甲酸酯的水解有限^[15], HJ-R 种群对灭多威的抗性中, 多功能氧化酶可能起主导作用。

Gunning 等^[1]曾报道澳大利亚棉铃虫种群对菊酯的抗性机制主要包括多功能氧化酶代谢、神经敏感性降低以及表皮穿透减少, 而与酯酶的关系不大。并且随着菊酯杀虫剂的限制使用, 主导抗性机制由神经敏感性降低转变为多功能氧化酶代谢。但最近 Cleen^[3]报道, 采自 Victoria 地区的棉铃虫, 对菊酯抗性机制中没有神经不敏感性因子的作用, 酯酶代谢成为其主要抗性机制之一, 显然田间用药历史不同, 其抗性机制也可能不同。吴益东等^[4]曾报道, 采自山东阳谷的高抗品系(443.8倍)经 PBO 增效后, 抗性降至17倍, PBO 增效达到26倍。本实验发现 HJ-R 种群多功能氧化酶, 酯酶活力也显著地高于 HD-S 种群($P < 0.05$), 同时 HJ-R 种群腹神经索对 10^{-5} mol/L 的氰戊菊酯也表现了2~3倍的神经不敏感性。由此可见, 我国田间棉铃虫种群对菊酯的抗性是由多功能氧化酶代谢、酯酶代谢、神经敏感性降低几种机制综合作用的结果。

参 考 文 献

- 1 Gunning R V, Easton C S, Balfe M E *et al.* Pyrethroid resistance mechanisms in Australian *Helicoverpa armigera*. Pestic. Sci., 1991, **33**: 473~490
- 2 Ahmad M, Gladwell R T, McCaffery A R. Decreased nerve sensitivity is a mechanism of resistance in a pyrethroid resistant strain of *Heliothis armigera* from Thailand. Pestic. Biochem. Physiol., 1989, **35**: 165~171
- 3 Cleen D C, Hoffmann A A, McDonald G. Resistance to pyrethroids in *Heliothis armigera* from corn: adult resistance, larval resistance, and fitness effects. J. Econ. Entomol., 1994, **87**(5): 1 165~1 171
- 4 吴益东, 沈晋良, 尤子平. 棉铃虫对氰戊菊酯抗性遗传分析. 昆虫学报, 1995, **38**(1): 20~23

- 5 Asperen van K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Ins. Physiol.* , 1962, **8**: 401~416
- 6 Clark A G, Dick G L, Dauterman W C *et al.* Kinetic studies on a glutathion S-transferase from the larvae of *Costelytra zealandica*. *Biochem. J.* , 1984, **217**: 51~58
- 7 Shang C, Soderlund D M. Monooxygenase activity of tobacco budworm (*Heliothis virescens* H.) larvae; tissue distribution and optimal assay conditions for the gut activity. *Comp. Biochem. Physiol.* , 1984, **79B** (3): 407~411
- 8 贵阳医学院生物化学教研室, 衡阳医学院生物化学教研室, 广州医学院生物化学教研室合编. 生物化学实验. 贵阳: 贵州人民出版社, 1988, 52~53
- 9 Gorun V. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterase in crude enzymatic preparation. *Analytic. Biochem.* , 1978, **86**: 324~326
- 10 唐振华. 昆虫抗药性及其治理. 北京: 农业出版社, 1993, 277~278
- 11 Main A R, Iveron F. Measurement of the affinity and phosphorylation constants govern irreversible inhibition of cholinesterases by diisopropyl phosphorofluoridate. *Biochem. J.* , 1966, **100**: 525~531
- 12 刘安西, 陈守同. 昆虫电生理学实验研究法, 北京: 科学出版社, 1991, 26~38
- 13 Hama H, Kono Y. Decreased sensitivity of central nerve to fenvalerate in the pyrethroid-resistance diamondback moth, *Plutella xylostella* Linne. *Appl. Ent. Zool.* , 1987, **22**(2): 176~180
- 14 Gunning R V, Balfe M E, Easton C S. Carbamate resistance in *Heliothis armigera* in Australia. *J. Aust. Ent. Soc.* , 1992, **31**: 97~103
- 15 Oppenoorth F J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Oxford: Pergamon press, 1985, **12**: 183~262

BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF INSECTICIDE RESISTANCE IN *HELICOVERPA* *ARMIGERA* (HÜBNER)

Zhang Youjun

(*Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Agricultural Academy of Science Beijing 100081*)

Zhang Wenji Han Xilai Li Xuefeng

(*Department of Applied Chemistry, China Agricultural University Beijing 100094*)

Abstract Mechanisms of insecticide resistance were studied in a field-selected resistant population (HJ-R) of *Helicoverpa armigera*. The fifth instar larvae of HJ-R strain possessed higher activity of esterase, glutathion S-transferase, monooxygenase than that of susceptible strain (HD-S). There was no significant difference between the two strains in sensitivity of acetylcholinesterase to insecticide. The central nervous system of HJ-R strain showed 2~3 time more insensitive to the action of fenvelerate. The metabolic detoxication was the main reason of resistance to organophosphorus and carbamate insecticides. The monooxygenase seems to be the most important mechanism of carbamate resistance in HJ-R population. The resistance to pyrethroids were caused by both target insensitivity and metabolic detoxication of monooxygenase and esterase.

Key words *Helicoverpa armigera*, carboxylesterase, monooxygenase, glutathion S-transferase, target insensitivity