

棉铃虫的谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs):杀虫药剂和植物次生性物质的诱导与 GSTs 对杀虫药剂的代谢*

高希武 董向丽 郑炳宗 陈青

(中国农业大学昆虫系 北京 100094)

摘要 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 中肠谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 对甲基对硫磷和灭多威的代谢能力明显高于对马来酸二乙酯 (DEM) 和两个混剂。LD₅₀剂量的对硫磷和灭多威对棉铃虫3龄幼虫 GSTs 的活性均没有诱导增加的影响,用 LD₅₀的选择剂量仅对硫磷组 GSTs 活性增加15%。用含0.01%的芸香苷、2-十三烷酮和槲皮素的人工饲料饲养棉铃虫经1~4代后, GSTs 活性提高4~18倍。3种植物次生性物质诱导组对灭多威和溴氰菊酯的敏感度均没有明显的变化,而槲皮素组对甲基对硫磷的敏感度则降低近一半,芸香苷和2-十三烷酮组对甲基对硫磷的敏感度略有降低。这种对甲基对硫磷敏感度的变化可能与上述 GSTs 活性的变化有关。

关键词 棉铃虫, 谷胱甘肽 S-转移酶, 杀虫剂敏感变, 植物次生性物质

谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 是昆虫对杀虫药剂代谢最重要的酶系之一,特别对有机磷类杀虫药剂的代谢^[1]。GSTs 能够催化内源性的谷胱甘肽 (GSH) 对底物进行亲核共轭代谢^[2]。已经证明 GSTs 在一些昆虫的抗药性中起着重要的作用^[3]。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 是许多经济作物的主要害虫^[4],目前,棉铃虫的抗药性已经成了化学防治能否奏效的重要因子。高希武等^[5,6],已经报道了一些化合物,能够改变棉铃虫体内 GSTs 以及其它解毒酶系的活性。本文主要是报道棉铃虫体内 GSTs 对杀虫药剂的代谢作用以及植物次生性物质对棉铃虫体内 GSTs 的影响及其与植物次生性物质诱导棉铃虫耐药性的关系。

1 材料和方法

1.1 化学试剂

1-氯-2,4-二硝基苯 (CDNB)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和马来酸二乙酯 (DEM) 为 Sigma 公司产品。2-十三烷酮为 Aldrich 产品,槲皮素为中国预防医学科学院产品,芸香苷为上海黄河制药厂产品。杀虫药剂均为含量大于90%的原药。

* 国家自然科学基金资助项目

1995-09-11收稿,1996-07-30收修改稿

1.2 供试虫源

棉铃虫在室内饲养, 光照 16 h, 温度为 25 °C, 新采集的田间棉铃虫种群在室内人工饲料上饲养 6~8 代后, 分别用以下 4 种饲料饲养, (1) 单独人工饲料; (2) 加 0.01% 的槲皮素; (3) 加 0.01% 的芸香苷; (4) 加 0.01% 的十三烷酮。在 F₁ 或 F₂ 分别测定 4 个棉铃虫种群对溴氰菊酯、甲基对硫磷和灭多威的敏感度。

1.3 生物测定方法

采用点滴法, 检查施药后 48 h 死亡率。

1.4 GSTs 活性测定

(1) 酶液提取: 将棉铃虫解剖, 取中肠进行匀浆, 匀浆液在 6 000 g 离心 10 min, 取上清液用于酶活性测定; (2) GSTs 活性测定: 按 Habig 等^[7]方法测定。

2 结果

2.1 GSTs 对一些杀虫药剂的代谢作用

表 1 显示出棉铃虫体内 GSTs 对甲基对硫磷、灭多威、增效磷 (SV₁)、马来酸二乙酯 (DEM) 和两个混剂的代谢作用。其中对甲基对硫磷和灭多威有较强的降解作用, 以 GSH 消耗量表示, 分别为 14.81% 和 14.72%。通常认为 SV₁ 对 GSTs 有一定的抑制作用, 但是结果表明同样可以被 GSTs 降解 (9.68%)。DEM 是 GSTs 的专一性抑制剂, 降解率仅为 4.82% 而对两个混剂的代谢作用在该试验条件下则没有检测到。说明棉铃虫 GSTs 对不同结构的化合物代谢能力不同。可以通过混剂降低 GSTs 的作用。

表 1 谷胱甘肽 S-转移酶对一些杀虫药剂的代谢作用

化合物	处理 (OD ₄₁₂)	对照 (OD ₄₁₂)	GSH 消耗 (%)
甲基对硫磷	0.575 ± 0.148	0.675 ± 0.212	14.81
灭多威	0.510 ± 0.045	0.598 ± 0.047	14.72
增效磷	0.532 ± 0.016	0.598 ± 0.041	9.68
农友 1 号*	0.648 ± 0.202	0.640 ± 0.078	0
农友 2 号*	0.627 ± 0.129	0.605 ± 0.040	0
DEM	0.539 ± 0.004	0.623 ± 0.024	4.82

* 农友 1 号为甲基对硫磷和灭多威的混剂; 农友 2 号为甲基对硫磷、灭多威和增效磷 (SV₁) 的混剂

2.2 杀虫药剂对棉铃虫 GSTs 的诱导和选择作用

以 LD₅ 剂量的对硫磷处理 3 龄棉铃虫幼虫 24 h 后, GSTs 活性与对照组没有显著差异, 48 h, 酶活性降低 19%; 而 LD₅₀ 处理组 24 h, GSTs 活性提高 15% (表 2)。说明 LD₅₀ 处理组 GSTs 活性提高不是对硫磷的诱导作用而是选择作用造成的 (死亡率为 58%)。LD₅ 剂量的灭多威处理棉铃虫 3 龄幼虫后, 在 24 h 和 48 h, GSTs 活性分别降低 78% 和 43%, 而 LD₅₀ 剂量处理后 24 h, GSTs 活性没有明显改变 (表 2)。说明灭多威对 GSTs 活性的提高

没有选择（死亡率39%）优势。

GSTs 对正常底物 CDNB 的亲合力, LD₅ 剂量处理时, 对硫磷处理组明显降低 (*K_m* 值是对照组的 2.78 倍), 灭多威组稍有降低 (*K_m* 值是对照组的 1.39 倍)。到 48 h, 对硫磷组与对照组无明显差异, 而灭多威组, GSTs 的亲合力明显降低 (*K_m* 值是对照的 2 倍)。说明杀虫药剂对棉铃虫 GSTs 影响具有时间性, 对硫磷的影响发生的比较早, 而灭多威比较迟。这与阿特拉津对棉铃虫 GSTs 的诱导作用具有时间性是一致的^[5]。

表2 杀虫药剂对棉铃虫谷胱甘肽 S-转移酶的诱导和选择作用

处理	剂量	24 h 活性	活性增加 (%)	48 h 活性	活性增加 (%)
对照	0	0.303±0.08	—	0.320±0.07	—
对硫磷	LD ₅	0.263±0.04	-4	0.258±0.04	-19.4
	LD ₅₀	0.349±0.09	15.2	—	—
灭多威	LD ₅	0.065±0.02	-78.5	0.182±0.03	-43.1
	LD ₅₀	0.297±0.07	-20	—	—

2.3 植物次生性物质对棉铃虫对杀虫药剂敏感度及 GSTs 活性的影响

表3展示出槲皮素、芸香苷和2-十三烷酮对棉铃虫对甲基对硫磷、灭多威和溴氰菊酯敏感度的影响。在体重和剂量近似相等的情况下, 槲皮素种群对甲基对硫磷的敏感度明显降低, 约为取食人工饲料种群的一半, 而取食十三烷酮的种群则没有明显变化, 取食芸香苷的种群介于它们之间, 对甲基对硫磷的敏感度略有降低。对灭多威的敏感度, 取食芸香苷的种群降低到68%, 取食十三烷酮的种群提高到121%, 而槲皮素种群则没有明显的改变。对溴氰菊酯的敏感度, 这些植物次生性物质则没有明显的影响。

十三烷酮、芸香苷和槲皮素对棉铃虫体内的 GSTs 具有明显的诱导作用, 和人工饲料种群相比, 槲皮素种群酶活性提高近17倍, 十三烷酮和芸香苷种群酶活性提高了3~4倍 (表4)。植物次生性物质诱导种群对甲基对硫磷敏感度降低可能与该种群 GSTs 活性增加有关。

表3 植物次生性物质对棉铃虫对一些杀虫药剂敏感度的影响

杀虫药剂	种群	剂量 (μg/g)	处理虫数 (头)	校正死亡率 (%)	相对敏感度*
甲基对硫磷	人工饲料	114.12	100	81.78±4.44	100
	槲皮素 (F ₁)	94.52	47	46.91±5.13	57
	十三烷酮 (F ₁)	79.69	80	80.28±5.23	98
	人工饲料	78.22	100	82.41±6.07	100
	芸香苷 (F ₂)	86.11	87	59.78±4.45	73
灭多威	人工饲料	180.72	100	49.29±6.30	100
	槲皮素 (F ₁)	151.31	47	52.01±7.98	106
	十三烷酮 (F ₁)	162.88	75	59.86±8.7	121
	人工饲料	426.77	70	58.72±8.03	100
	芸香苷 (F ₂)	469.44	80	40.00±5.67	68
溴氰菊酯	人工饲料	4.96	80	87.15±4.18	100
	十三烷酮 (F ₁)	4.46	98	73.60±5.34	84
	人工饲料	3.46	80	57.47±2.83	100
	芸香苷 (F ₂)	3.81	90	53.33±5.27	93

* 以人工饲料种群校正死亡率为100, 计算其它种群的相对值

3 讨论

GSTs 是杀虫药剂代谢中重要的共轭酶系之一^[8], 对不同类型的化合物代谢能力不同, 棉铃虫体内的 GSTs 对它的抑制剂 DEM 的代谢低于甲基对硫磷和灭多威。而以灭多威、甲基对硫磷和增效剂组成的混剂 (农友1号和农友2号) 则对

GSTs 的代谢具有较强的抵抗力 (表1), 说明通过不同化合物的组合克服 GSTs 的降解是有可能的。尽管灭多威和对硫磷对棉铃虫 GSTs 活性没有明显的诱导增加现象, 但是用 LD₅₀ 选择剂量的对硫磷处理却能使 GSTs 活性提高, 说明对硫磷对棉铃虫种群具有选择出高 GSTs 活性个体的潜力, 因此, 应尽量避免连续使用对硫磷防治棉铃虫。

不同结构的植物次生生物物质对棉铃虫 GSTs 的诱导能力具有明显的差异, 在试验的3种植物次生生物物质中, 槲皮素对 GSTs 的诱导能力最强, 约是2-十三烷酮和芸香苷的4倍。在亚热带粘虫 *Spodoptera frugiperda*^[9,10]、草地粘虫 *Spodoptera eridania*、美洲棉铃虫 *Heliothis zea*、美洲菸夜蛾 *Heliothis virescens*、粉纹夜蛾 *Trioxopusia ni*、黎豆夜蛾 *Anticarsia gemmatilis*^[11,12], 大豆夜蛾 *Pseudoplusia includen*^[13] 和 *Platynotus idaeusalis*^[14] 等昆虫中也证明了不同寄主植物或不同结构的次生生物物质对 GSTs 的诱导能力是不同的, 而且不同诱导剂诱导产生的 GSTs 对模式底物的专一性没有改变^[10], 但是, 在我们的试验中发现, LD₅₀ 剂量的对硫磷或灭多威能够改变 GSTs 对模式底物 (CDNB) 的亲合力。在许多害虫中也发现了寄主植物或植物次生生物物质能够影响其对杀虫药剂的敏感度^[15~21]。但是在我们的试验的3种植物次生生物物质中, 只有槲皮素诱导的棉铃虫对甲基对硫磷的敏感度降低近1倍, 说明不同类型的植物次生生物物质对棉铃虫与药剂相互关系的影响是不同的。寄主植物或植物次生生物物质对昆虫多功能氧化酶 (MFO)、羧酸酯酶等其它解毒酶系^[22,23] 以及靶标酶 (AChE)^[24] 也具有明显的影响。

寄主-昆虫-杀虫药剂之间的相互关系是比较复杂的, 不同组合, 其影响的方式及程度会有不同。寄主植物及其次生生物物质诱导的解毒酶系与杀虫药剂的代谢酶系相同或相近^[25], 使得取食含有高浓度次生生物物质的植物的昆虫对杀虫药剂的解毒代谢增加, 从而耐药性或抗药性增加。抗虫育种往往是使一些对昆虫有影响的植物次生生物物质的基因集中, 使之对昆虫的抗药性增加, 因此, 抗虫品种对害虫的耐药性或抗药性也会产生影响。

参 考 文 献

- 1 Dauterman W C. Insect metabolism; extramicrosomal. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology. New York: Pergamon Press, 1985, 12: 713~730
- 2 Soderlund D M, Bloomquist J R. Molecular Resistance in Arthropods. In: Roush R T, Tabashnik B E eds. New

表4 植物次生生物物质对棉铃虫谷胱甘肽 S-转移酶活性的影响

种群	测定次数	比活力*	显著性测验 ($P < 0.01$)	相对活性**
人工饲料	9	29.9 ± 1.0	A	100
十三烷酮	8	130 ± 33	B	435
芸香苷	9	150 ± 49	B	502
槲皮素	6	540 ± 85	C	1 806

* 比活力单位为 mOD 值/mg 蛋白质, min;

** 以人工饲料种群为100, 计算其它种群的相对活性

- York; Chapman & Hall Press, 1990, 58~96
- 3 Oppenoorth F J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. New York; Pergamon Press, 1985, **12**: 731~773
 - 4 Read W, Paker C S. *Heliothis*; a global problem. In: *Proceedings of the International Workshop on Heliothis Management (1981)*, ICRISAT, 1982, 9~14
 - 5 高希武, 梁同庭. 阿特拉津和敌敌畏对棉铃虫和家蝇羧酸酯酶以及 GSH-S-转移酶的诱导作用. *昆虫学报*, 1993, **36**: 166~177
 - 6 高希武, 郑炳宗, 林彬. 棉铃虫抗药性的毒理学和生物化学. 见: 中国科协第二届青年学术年会执行委员会编. *生命科学进展*. 北京: 中国科学技术出版社, 1995, 365~372
 - 7 Habig W H. Assays for differentiation of glutathione s-transferases. In: William B J ed. *Method in Enzymology*. New York: Academic Press, 1981, **77**: 398~405
 - 8 O'Brien R D. *Insecticides-Action and Metabolism*. New York: Academic Press, 1967
 - 9 Yu S J. Host plant induction of glutathione s-transferase in the fall armyworm. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1982, **18**: 101~106
 - 10 Yu S J. Interactions of allelochemicals with detoxification enzymes of insecticide susceptible and resistant fall armyworm. *Pestic Biochem. Physiol.*, 1984, **22**: 60~68
 - 11 Yu S J. *Toxicology of agricultural important insect pests of Florida*. Criss CD-Rom, 1992
 - 12 Yu S J. Induction of detoxifying enzymes by allelochemicals and host plants in the fall armyworm. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1983, **19**: 330~336
 - 13 Sparks T C. *The Biochemistry, Physiology and Toxicology of Insect Control Agents*. Criss CD-Rom, 1992
 - 14 Hunter M D, Biddinger D J, Carlini E J *et al.* Effects of apple leaf allelochemistry on tufted apple bud moth (Lepidoptera; Tortricidae) resistance to azinphosmethyl. *J. Econ. Entomol.*, 1994, **87**: 1 423~1 429
 - 15 谭维嘉, 曹煜, 戴小枫. 棉铃虫对菊酯类农药抗性的系统监测与分析. 见: *青年生态学者论坛 (二)*, 北京: 科学技术出版社, 1992, 283~287
 - 16 谭维嘉, 赵焕香. 取食不同寄主植物的棉铃虫对溴氰菊酯敏感性的变化. *昆虫学报*, 1990, **33**: 155~160
 - 17 Kennedy G G, Farrar R R, Riskallah M R. Induced tolerance of neonate *Heliothis zea* to host plant allelochemicals and carbaryl following incubation of eggs on foliage of *Lycopersion hirsutum f. glabratum*. *Oecologia*, 1987, **73**: 615~620
 - 18 Robertson J L, Armstrong K F, Suckling D M *et al.* Effects of host plants on the toxicity of azinphosmethyl to susceptible and resistant light brown apple moth (Lepidoptera; Tortricidae). *J. Econ. Entomol.*, 1990, **83**: 2 124~2 129
 - 19 Loganathan M, Gopalan M. Effect of host plants on the susceptibility of *Heliothis armigera* Hübner to insecticides. *Indian J. of Plant Protection*, 1985, **13**: 1~4
 - 20 Abd-Elghafar S F, Dauterman W C, Hodgson E. In vivo penetration and metabolism of methyl parathion in larvae of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.), fed different host plants. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1989, **33**: 49~56
 - 21 Riskallah M R, Dauterman W C, Hodgson E. Host plant induction of microsomal monooxygenase activity in relation to diazinon metabolism and toxicity in larvae of the tobacco budworm *Heliothis virescens* (F.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1986, **25**: 233~247
 - 22 Yu S J. Consequences of induction of foreign compound-metabolizing enzymes in insects. In: Brattsten L B, Ahmad S eds. *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*, New York; Plenum Press, 1986, 153~174
 - 23 高希武. 寄主植物对棉蚜羧酸酯酶活性的影响. *昆虫学报*, 1992, **35**: 267~272
 - 24 高希武, 郑炳宗. 棉蚜的化学生态学——寄主植物对棉蚜乙酰胆碱酯酶性质的影响. 见: 黄可训主编. *首届全国中青年植物保护科技工作者学术讨论会论文集*. 北京: 中国科学技术出版社, 1991, 456~461
 - 25 Ahmad S, Brattsten L B, Mullin C A *et al.* Enzymes involved in the metabolism of plant allelochemicals. In: Brattsten L B, Ahmad S eds. *Molecular Aspects of Insect Plant Associations*, New York; Plenum Press, 1986, 73~152

GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (GSTs) OF *HELICOVERPA ARMIGERA*: INDUCTION OF INSECTICIDES AND PLANT ALLELOCHEMICALS AND METABOLISM OF INSECTICIDES

Gao Xiwu Dong Xiangli Zheng Bingzong Chen Qing

(Department of Entomology, China Agricultural University Beijing 100094)

Abstract Induction of glutathione S-transferases (GSTs) by insecticides and plant allelochemicals, and metabolism of insecticides by GSTs were investigated during 1992~1995 in cotton bollworms, *Helicoverpa armigera* (Hübner). GSTs of the midguts from cotton bollworms metabolized parathion-methyl and methomyl more quickly than diethylmaleate, o, o-diethyl-phenyl phosphorothioate (SV₁) and mixtures of parathion-methyl and methomyl. At 24 h or 48 h after treatment with LD₅ of parathion or methomyl, the GSTs activity of cotton bollworms did not increase. Selection of LD₅₀ of parathion made GSTs activity increase 15% while selection of LD₅₀ of methomyl had no effect on GSTs activity. Midgut GSTs activity in cotton bollworm larvae was induced up to 18-fold by feeding on the artificial diet containing 0.01% of quercitrin compared with activity in larvae only fed with artificial diet and up to 4-fold compared with activity in larvae fed with the diet containing 2-tridecanone or rutin. Toxicity of parathion-methyl to larvae of cotton bollworms reduced about 50% due to feeding on the diet with quercitrin. But the 0.01% of rutin, quercitrin and 2-tridecanone in diet had no effects on toxicities of methomyl and deltamethrin to larvae of cotton bollworms.

Key words *Helicoverpa armigera* (Hübner), insecticide susceptibility, allelochemical, glutathione S-transferase