

· 研究简报 ·

不同防治田内不同发育期拟环纹豹蛛乙酰胆碱酯酶及羧酸酯酶的活性比较

王智^{1*}, 付秀芹², 宋大祥³, 颜亨梅²

(1. 湖南文理学院 生命科学系, 湖南 常德 415000; 2. 湖南师范大学 生命科学学院, 湖南 长沙 410081;

3. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 利用紫外分光光度法研究了生物防治田和化学防治田内不同发育期拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和羧酸酯酶 (CarE) 的活性特征。结果表明, 化防田拟环纹豹蛛各发育时期 AChE 活性均较生防田中的低, 其各发育期 AChE 的 K_m 值也均明显高于生防田种群。从整个发育期来看, 幼体的 AChE 活性最高, 卵囊的最低, 说明不同发育阶段 AChE 活性存在较大差异。而 CarE 的活性正相反, 化防田种群卵囊、幼蛛、雌成蛛和雄成蛛的 CarE 活性均高于相应生防田种群, 且幼蛛的 CarE 活性高于相应成蛛, 生防田种群每一发育阶段 CarE 的 K_m 值也均高于相应的化防田种群。表明化防田中的拟环纹豹蛛有可能对部分农药产生了一定程度的抗药性。

关键词: 拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata*; 乙酰胆碱酯酶; 羧酸酯酶; 活性; 抗药性

中图分类号: S481.1; S481.4 文献标识码: A 文章编号: 1008-7303(2006)02-0180-04

Study on Activity of Acetylcholinesterase and Carboxylesterase in *Pardosa pseudoannulata* Body in Different Control Rice Field and Its Different Development Stage

WANG Zhi^{1*}, FU Xiu-qin², SONG Da-xiang³, YAN Heng-mei²

(1. Department of Life Science, Hunan Arts and Science University, Changde 415000, China;

2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

3. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: The activity of acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CarE) in *Pardosa pseudoannulata* body were systemically studied in different control rice field and its different development stage by ultraviolet spectroscopy. The result showed that specific activity of AChE and K_m value at different development stage of chemical control rice field population (CCP) were higher than that at different development stage of bio-control rice field population (BCP). In total development process of *Pardosa pseudoannulata*, specific activity of AChE at instar body was highest, the least at ovum stage. It dedicated that specific activity of AChE exists difference at different development stage of *Pardosa pseudoannulata*. On the contrary, specific activity of CarE at different

收稿日期: 2005-09-30; 修回日期: 2006-03-13.

作者简介: *王智 (1968-), 男, 通讯作者, 湖南新邵人, 博士, 副教授, 主要从事生态学和害虫生态调控研究. 联系电话: 13087361755; Email: wangzhispider@hotmail.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (03030041).

development stage of CCP was higher than that at corresponding development stage of BCP, and specific activity of CarE at instar stage was higher than that at adult stage. Kinetics studies showed that K_m values of CarE at different development stage of BCP were larger than that at corresponding development stage of CCP. The result indicated that *Pardosa pseudoannulata* may raise the resistance to some chemical pesticides in chemical control rice field.

Key words: *Pardosa pseudoannulata*; acetylcholinesterase (AChE); carboxylesterase (CarE); activity; resistance

稻田蜘蛛是稻田害虫的重要捕食性天敌,在害虫的生态调控和无公害农业中起着非常重要的作用^[1,2]。化学防治在保证作物增产的同时,也对蜘蛛等害虫天敌造成了危害^[3],因而科学合理地使用农药并设法提高蜘蛛等天敌对杀虫剂的抗药性,使其得到更好的利用也就成了害虫综合防治的重要研究课题。有关害虫不同虫态、不同虫龄间的抗药性差异已有一些研究报道^[4],有关蜘蛛对农药敏感性的初步研究也有报道^[5],但对蜘蛛不同发育阶段药剂敏感性相关酶系活性的研究还未见报道。笔者以稻田蜘蛛优势种拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* 为代表,对其不同发育阶段化防田种群和生防田种群体内与抗药性相关的酶系乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和羧酸酯酶 (CarE) 的活性及动力学参数进行了比较研究。结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

碘化硫代乙酰胆碱 (ATCh)、考马斯亮蓝 G-250 (Fluka 公司产品); 5,5-二硫代双硝基苯甲酸 (DTNB, Roth 公司产品); 毒扁豆碱 (化学纯,上海化工总厂产品); 乙酸萘酯 (NA, 分析纯,北京化工厂产品); 十二烷基硫酸钠和坚固蓝 B 盐 (Sigma 公司产品); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试蛛来源

生防田内的拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* 成蛛和卵囊采自湖南省长沙市天顶乡长期未接触农药的生物防治稻田 (近 8 年未施用任何农药); 常规化防田内的拟环纹豹蛛成蛛和卵囊采自湖南省常德市鼎城区 (主要以有机磷农药进行防治); 5 龄幼蛛均由从生防田和化防田采得的卵囊在室内人工孵化所得。生防田内的拟环纹豹蛛各发育阶段统称作生防田种群, 常规化防田内的拟环纹豹蛛各发育阶段统称作化防田种群。

1.3 酶源制备

将待测的拟环纹豹蛛卵囊 5 个、成蛛 3 只、幼蛛 5 只分别置于 1 mL 冰冷的 0.067 mol/L (pH 7.2) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中匀浆, 在 0~4 °C 下以 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用作酶源。试验设 3 次重复。

1.4 可溶性蛋白含量测定

参照 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 法^[6]。

1.5 AChE 比活力的测定

参照高希武^[7]报道的方法。以乙酰胆碱为底物, 反应体系总体积为 3.0 mL。取 0.1 mL 酶液, 加入 0.1 mL 0.080 mol/L 的 ATCh 和 0.7 mL、0.067 mol/L 的 PBS (pH 8.0) 缓冲液, 于 30 °C 下反应 30 min 后, 加入 0.3 mL 0.001 mol/L 的毒扁豆碱, 随后再加入 1.8 mL 0.01 mol/L 的 DTNB-磷酸盐-乙醇试剂 (12.4 mg DTNB、120 mL 96% 的乙醇和 80 mL 蒸馏水以 0.2 mol/L pH 7.5 的 PBS 缓冲液定容至 250 mL) 终止反应, 于波长 412 nm 处测 OD 值。

1.6 CarE 比活力的测定

参照 Hama 等^[8]的方法。取 0.05 mL 酶液, 加入 2.0 mL 3.0×10^{-4} mol/L 的 NA 和 0.45 mL 0.2 mol/L 的 PBS (pH 7.5) 缓冲液, 于 30 °C 下反应 30 min 后, 加入 0.5 mL 显色剂 (质量分数为 1% 的固蓝 B 盐水溶液与 5% 的十二烷基磺酸钠水溶液在反应前以体积比 2:5 混合), 15 min 后在波长 600 nm 处测 OD 值。

1.7 AChE 和 CarE 动力学参数测定

根据 Lineweaver-Burk 作图法求 K_m 值。

2 结果与分析

2.1 拟环纹豹蛛不同发育期 AChE 比活力及其 K_m 值

从表 1 可知, 化防田拟环纹豹蛛各发育期

AChE活性均较生防田中的低,其卵囊、幼蛛、雌成蛛和雄成蛛的AChE比活力分别是相应生防田的0.78、0.96、0.90和0.74倍。其中尤以生防田种群卵囊及雄成蛛的AChE比活力与相应化防田种群卵囊及雄成蛛差异更为明显,说明生防田中拟环纹豹蛛卵囊及雄成蛛对农药的抗性较弱。从整个发育期来看,幼蛛的AChE活性最高,成蛛次之,卵囊最低,说明在不同的发育阶段,AChE活性存在较大差异。

化防田种群各发育期AChE的 K_m 值均明显高于生防田种群,其卵囊、幼蛛、雌成蛛和雄成蛛的 K_m 值分别为生防田种群的1.56、1.94、1.85和2.78倍,表明化防田种群AChE对底物的亲和性较生防田种群低。化防田种群AChE的活力均低

于生防田种群,这符合变构AChE的特点^[9],即农药胁迫所导致AChE结构上的变化可能是拟环纹豹蛛抗药性形成的分子机理。

2.2 拟环纹豹蛛不同发育期CarE比活力及其 K_m 值

从表2可知,化防田种群卵囊、幼蛛、雌成蛛和雄成蛛的CarE活性均高于相应生防田种群,分别为相应生防田种群的5.63、2.58、1.84和1.27倍,且幼蛛的CarE活性均高于相应成蛛。生防田种群各发育期CarE的 K_m 值均大于相应的化防田种群,说明生防田种群各发育期CarE对底物的亲和性均较相应化防田种群低。因此,CarE活性的提高可能是拟环纹豹蛛抗药性形成的一个重要因素。

Table 1 Specific activity and K_m value of AChE at different development stages of *P. pseudoannulata*

Stages of development*	Specific activity / (nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹)	Index (Rx/Sx)	K_m (× 10 ⁻⁵)	K_m index (Rx/Sx)
SE	4.814 ± 0.005	1.00	1.636 ± 0.031	1.00
RE	3.747 ± 0.003	0.78	2.545 ± 0.016	1.56
SY	15.821 ± 0.307	1.00	0.447 ± 0.005	1.00
RY	15.151 ± 0.261	0.96	0.867 ± 0.026	1.94
S	12.910 ± 0.215	1.00	0.293 ± 0.012	1.00
R	11.634 ± 0.129	0.90	0.541 ± 0.017	1.85
S	13.153 ± 0.126	1.00	0.419 ± 0.032	1.00
R	9.723 ± 0.051	0.74	1.167 ± 0.043	2.78

* SE: Ovum of in biological control field; RE: Ovum of in chemical control field; SY: Instar in biological control field; RY: Instar in chemical control field; S : Adult female in biological control field; R : Adult female in chemical control field; S : Adult male in biological control field; R : Adult male in chemical control field. The same as in table 2.

Table 2 Specific activity and K_m value of carboxylesterase at different development stages of *P. pseudoannulata*

Stages of development	Specific activity / (nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹)	Index (Rx/Sx)	K_m (× 10 ⁻⁵)	K_m index (Rx/Sx)
SE	1.351 ± 0.026	1.00	18.811 ± 0.038	1.00
RE	7.606 ± 0.112	5.63	8.051 ± 0.762	0.43
SY	4.026 ± 0.016	1.00	12.348 ± 1.023	1.00
RY	10.385 ± 0.225	2.58	9.562 ± 0.915	0.78
S	3.124 ± 0.039	1.00	32.051 ± 4.032	1.00
R	5.745 ± 0.087	1.84	9.625 ± 0.367	0.30
S	2.844 ± 0.013	1.00	15.152 ± 2.026	1.00
R	3.616 ± 0.020	1.27	14.472 ± 1.526	0.96

3 讨论

在抗药性研究方面,对害虫及螨类抗性的研究较多,目前已发现500多种害虫及螨类对一种

或多种农药产生了抗药性^[9,10]。许多研究发现,害虫表皮穿透代谢解毒和靶标部位不敏感等抗性机制的表达均与害虫的生长发育阶段密切相关^[11,12]。但对天敌抗药性的研究相对较少,1991年

Croft统计共有 32 种天敌产生了不同程度的抗药性^[13], 2002 年据冯涛等^[14]统计, 国内外共报道有 44 种天敌对某一种或几种杀虫剂产生了抗药性。有关蜘蛛抗药性的研究仅见彭宇^[15]探讨了丙溴磷对草间钻头蛛 *Hylyphantes graminicola*、丙溴磷和阿维菌素对三突花蛛 *Misumenops tricuspidatus* 的毒力影响, 郑少雄等^[16]初步探讨了异丙威对食虫沟瘤蛛 *Oedothorax insecticops* 和驼背额角蛛 *Gnathocharium gibberum* 的毒力影响。本研究首次探讨了不同防治方式稻田中不同发育期拟环纹豹蛛体内 AChE 和 CarE 的活性差异, 结果发现化防田拟环纹豹蛛各发育期 AChE 活性均较生防田中的低, 而 CarE 的活性正好相反。同时发现, 不论化防田种群还是生防田种群, 从幼体——成体——卵囊, AChE 活性逐渐降低; 化防田种群从幼体——卵囊——雌成蛛——雄成蛛, CarE 活性依次下降, 生防田种群从幼体——雌成蛛——雄成蛛——卵囊, CarE 活性依次降低。据实验结果看, 化防田中的拟环纹豹蛛对有机磷类农药有可能产生了一定程度的抗性。

参考文献:

- [1] Nyffeler M, Bentz G. Spiders in natural pest control [J]. *J Appl Ent*, 1987, 103: 321-339.
- [2] Wang Z, Kim J P. Study on interaction of the diversity of rice field spider community and its objective pests occurring degree [J]. *Korean Arachnology*, 2002, 18 (1): 39-45.
- [3] Kenmore P E, Carino F O, Perez C A, et al Population regulation of the rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) with rice fields in Philippines [J]. *J Plant Protection in the Tropics*, 1984, (1): 19-37.
- [4] YAO Hong-wei (姚洪渭), CHENG Jia'an (程家安). 白背飞虱体内解毒酶系的发育期变化及化学药剂的影响 [A]. *Chinese Entomology of Moving Toward 21 Century—Proceedings of 2000 Academic Discussion (走向 21 世纪的中国昆虫学——中国昆虫学会 2000 年学术年会论文集)* [C]. Beijing (北京): Science and Technology Press (科技出版社), 2000. 270-273.
- [5] PENG Yu (彭宇), WANG Yin-chang (王荫长), HAN Zhao-jun (韩召军). 蜘蛛对农药敏感性的测定方法 [J]. *Chin J Zool (动物学杂志)*, 2001, 36 (3): 47-49.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [7] GAO Xi-wu (高希武). Gonun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍 [J]. *Entomological Knowledge (昆虫知识)*, 1987, 24 (4): 245-246.
- [8] Hama H, Hosoda A. High aliesterase activity of the acetyl cholinesterase sensitivity involved in organophosphorus and carbamate resistance of the brown planthopper [J]. *Appl Entomol Zool*, 1983, 18 (4): 475-485.
- [9] Brattsten L B. Insecticide resistance: research and management [J]. *Pestic Sci*, 1989, 26: 329-332.
- [10] TANG Zhen-hua (唐振华). 昆虫抗药性及其治理 [M]. Beijing (北京): Agriculture Press (农业出版社), 1993.
- [11] ZHANG Wen-ji (张文吉), ZHANG You-jun (张友军), HAN Xi-lai (韩熹莱). 棉铃虫不同龄期幼虫羧酸酯酶、谷胱甘肽转移酶、乙酰胆碱酯酶研究 [J]. *Acta Phytophylacica Sinica (植物保护学报)*, 1996, 23 (6): 157-162.
- [12] Patil T N, Abd EI Fattah ASA, Plapp F W, et al. ATPase and dehydrogenase activities from house flies susceptible and resistant to organochlorine insecticides [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1980, 13 (1): 5-12.
- [13] Croft B A. *Arthropod Biology Control Agents and Pesticides* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1991.
- [14] FENG Tao (冯涛), PENG Yu (彭宇), LU Feng-xiang (刘凤想), et al 昆虫天敌抗药性研究进展 [J]. *Natural Enemies of Insects (昆虫天敌)*, 2002, 24 (4): 180-184.
- [15] PENG Yu (彭宇), HAN Zhao-jun (韩召军), WANG Yin-chang (王荫长). 四种杀虫剂对草间钻头蛛和三突花蛛的毒力测定 [J]. *J Nanjing Agric Univ (南京农业大学学报)*, 2003, 23 (4): 117-119.
- [16] ZHENG Shao-xiong (郑少雄), ZHANG Zheng-lou (章正楼), ZHU Rui-liang (朱瑞良). 化学农药对稻田蜘蛛的影响 [J]. *Natural Enemies of Insects (昆虫天敌)*, 1985, 7 (2): 100-103.

(Ed. TANG J)