

· 研究论文 ·

氟虫腈对二化螟生长发育的影响及对解毒酶的诱导效应

李晓涛¹, 黄青春^{1*}, 唐振华^{1,2}

(1. 华东理工大学 药学院, 上海 200237; 2. 中国科学院 上海植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要:研究了氟虫腈对不同虫态二化螟 *Chilo suppressalis* 的作用特点、持续毒性及对解毒酶的诱导效应。结果表明:氟虫腈对二化螟幼虫具有很强的毒杀作用,且毒杀作用随幼虫龄期的增长而逐渐减弱;对二化螟蛹的羽化具有较低的抑制作用;对卵孵化无抑制作用。亚致死剂量氟虫腈能引起幼虫持续死亡,降低存活试虫体重增长率和蛹重。用亚致死剂量氟虫腈处理 4 龄幼虫后,对其体内羧酸酯酶活性具有明显的诱导效应和时间效应,对谷胱甘肽-S 转移酶活性的诱导效应仅在药剂处理后 3 h 内较为显著,对多功能氧化酶活性表现出较强的诱导效应,比活力约为对照的 1.37 倍。

关键词:氟虫腈; 亚致死效应; 二化螟; 解毒酶

中图分类号: S481.1

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)03-0250-05

Effects of Fipronil on Larval Development and the Induction to Detoxification Enzyme Activity of *Chilo suppressalis*

L I X iao-tao¹, HUANG Q ing-chun^{1*}, TANG Zhen-hua^{1,2}

(1. Institute of Pesticides and Pharmaceuticals, East China University of Science & Technology,

Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology,

Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: The characteristics of action, persistent toxicity and enzyme induction of fipronil on rice stem borer, *Chilo suppressalis* were taken into investigation. Results showed that fipronil had powerful insecticidal activity against the larvae of *Chilo suppressalis*, but the sensitivity of the larvae to the toxicity of fipronil was gradually decreased along with their growth. However, fipronil showed lower inhibitory activity against pupae eclosion and no activity against egg hatchability. Fipronil with sublethal doses could persistently induce the larvae dead, and decrease the rate of weight increasing of survival larvae, even the weight of succedent pupae. After treated by fipronil with sublethal doses, the activity of carboxylesterase in 4th instar larvae was induced and kept higher than the control except for the larvae metamorphosis; glutathione-S-transferases activity was significantly improved in 3 hours from the drug application; and the activity of microsomal multifunctional oxidases was enhanced up to 1.37 times higher than the control during the whole experiments.

Key words: fipronil; sublethal effect; *Chilo suppressalis*; detoxification enzyme

收稿日期: 2006-05-19; 修回日期: 2006-08-07.

作者简介: 李晓涛 (1982-), 男, 硕士研究生; * 通讯作者: 黄青春 (1969-), 男, 博士, 副教授, 主要从事农药生理毒理研究. 联系电话: 021-64253140-8007; E-mail: qchuang@ecust.edu.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 ("973" 计划) (2003CB114402); 上海市科委基础重点项目.

在农业生态系统中,杀虫剂除对昆虫具有直接的杀死作用外,还因其环境行为所产生的亚致死效应干扰昆虫体内相关酶系的代谢^[1,2]、生长发育和繁殖^[3,4]、信息传递和种群行为^[5-7]等,从而对害虫种群产生持续的控制作用。氟虫腈(fipronil)是昆虫GABA_a受体的强烈抑制剂,能够有效地阻滞神经轴突 γ -GABA调节的氯离子通道,并降低氯离子通道的开放频率^[8-10],对半翅目、鳞翅目、缨翅目、鞘翅目等害虫以及已对环戊二烯类、菊酯类、氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性的害虫都显示了极高的活性^[11]。但是,2001~2002年对浙、苏、皖、赣等4省水稻二化螟种群进行抗性检测发现,浙江苍南、瑞安等地区二化螟种群已对氟虫腈产生了低水平的抗性^[12]。室内亚致死剂量研究发现,氟虫腈对抗性种群存活率的持续影响作用大于对敏感种群,不仅能明显降低抗性和敏感种群二化螟的存活率、产卵量、卵孵化率等,使幼虫期延长,而且能增大敏感和抗性种群酯酶的 K_m 值^[13],表明亚致死剂量药剂的持续作用可能有助于害虫产生抗药性。为探明氟虫腈在稻田使用的合理控制抗性选择压力,作者研究了氟虫腈对不同虫态二化螟的作用特点、亚致死剂量对二化螟生长发育的影响规律以及对体内解毒酶的诱导效应,旨在为其合理使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

二化螟 *Chilo suppressalis* Walker 为国家南方农药创制中心(上海)长年室内驯化饲养的敏感试虫,幼虫以水稻幼苗饲养^[14]。饲养温度为(28±1),光照周期 16L:8D,光照强度大于 2 000 lx,相对湿度大于 80%。

1.2 供试药剂

氟虫腈(fipronil)原药,纯度为 87%,法国罗纳-普朗克公司产品。实验时配制成浓度为 0.001 5、0.005、0.01、0.02、0.04 g/L 的氟虫腈丙酮溶液,用微量点滴器点滴于二化螟幼虫的前胸背板。

乙酸-萘酯(p-NA)和 2,4-二硝基氯苯(CDNB)均为化学纯,购于上海试剂一厂;对硝基苯甲醚(p-NA)为分析纯,购于北京化工厂;固蓝 RR 盐及考马斯亮蓝 G-250(Fluka 公司产品);还原型谷胱甘肽(GSH)及还原型辅酶 Ⅳ 钠盐(NADPH N₄)(Sigma 公司产品);牛血清白蛋白(BSA)(德

国 B. M. 公司产品)。

1.3 实验方法

1.3.1 氟虫腈对不同虫态二化螟的毒力测定

分别选取 3~6 龄二化螟幼虫以及大小和重量较一致的蛹或数量相近的卵块,将上述各浓度氟虫腈丙酮溶液点滴于幼虫的前胸背板,每头点滴 1 μ L,每浓度处理 15 头试虫,单头饲养于试管中。蛹或卵块分别浸入不同浓度氟虫腈丙酮溶液中,3 s 后取出,晾干,置于培养皿中,在室温下饲养。每处理共 10 头蛹或 3 个卵块,所有处理均设 3 次重复,同时以丙酮处理为对照。24 h 后观察并记录幼虫死亡数,计算死亡率,同时记录蛹的羽化率以及卵的孵化率。试虫死亡标准以将其翻身后 30 s 内不能翻转为死亡。

1.3.2 氟虫腈对二化螟幼虫的持续毒性测定

选择大小和重量较一致的 4 龄二化螟幼虫,每头点滴 1 μ L 药液于前胸背板,与 1.3.1 节处理相同。每 24 h 定时观察并记录幼虫死亡数,称取存活幼虫体重,直到存活幼虫蜕变为蛹。计算各龄期幼虫的死亡率和相应的体重增长率,以及幼虫的化蛹率和蛹重。

1.3.3 氟虫腈对二化螟体内相关酶系的影响

1.3.3.1 酶液制备 将浓度为 0.001 5 g/L 的氟虫腈丙酮溶液点滴于 4 龄幼虫的前胸背板,每头点滴 1 μ L。分别于处理后 1、3、6、12、24、36、48、60、72 h 时取试虫置于冰箱中于 -72℃ 下保存,供相关酶系的活力测定,以丙酮处理的试虫作为对照。

1.3.3.2 羧酸酯酶(CarE)活性测定 将各时间段取出的 15 头二化螟幼虫置于 1.5 mL 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中匀浆,然后在 5 000 \times g、4℃ 下离心 15 min,取上清液作酶源。活性测定参照 Han 等^[15]的方法进行,酶的活力单位为 $OD_{450} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro}$ 。

1.3.3.3 谷胱甘肽-S 转移酶(GSTs)活性测定

将各时间段取出的 15 头试虫置于 1.5 mL 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中匀浆,然后在 10 000 \times g、4℃ 下离心 15 min,取上清液作酶源。活性测定参照 Kao 等^[16]的方法进行,酶的活力单位为 $OD_{340} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro}$ 。

1.3.3.4 多功能氧化酶(MFOs)活性测定 将各时间段取出的 15 头试虫置于 1.5 mL 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.8)中匀浆,然后在 12 000 \times g、0℃ 下离心 15 min,取上清液作酶源。活性测

定参照 Yang 等^[17]的方法进行,酶的活力单位为 $\text{nmol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro}$ 。

1.3.4 蛋白质含量测定 参照 Bradford 的方法进行^[18],以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 氟虫腈对不同虫态二化螟的作用特点

将不同浓度的氟虫腈直接作用于不同龄期的二化螟幼虫及其蛹和卵,结果(表1)表明其对二

化螟幼虫具有很强的毒杀作用。氟虫腈浓度为 0.005 g/L 时,3 龄幼虫的死亡率达 86.67%,而 6 龄幼虫的死亡率仅为 13.33%;当浓度升至 0.01、0.02、0.04 g/L 时,幼虫的死亡率也相应升高,但幼虫对氟虫腈的敏感性则随着龄期的增长而逐渐降低。同时发现,相同浓度的氟虫腈对二化螟蛹的羽化具有较低的抑制作用,而对卵孵化几乎没有抑制作用。

Table 1 Toxic effects of fipronil at different concentrations on different instar *Chilo suppressalis* larvae

Concentrations (g/L)	Percentage mortality of treated larvae				Inhibition of pupae eclosion (%)	Inhibition of egg hatchability (%)
	3 rd instar	4 th instar	5 th instar	6 th instar		
0.005	86.67 ± 3.33 b	53.33 ± 2.67 c	26.67 ± 2.34 b	13.33 ± 1.13 b	4.00 ± 0.32 aA	5.88 ± 0.52
0.01	93.33 ± 3.41 ab	66.67 ± 3.65 b	40.00 ± 1.41 b	20.00 ± 1.47 b	7.99 ± 0.54 bAB	4.84 ± 0.36
0.02	100.0 ± 0.00 a	93.33 ± 5.33 a	73.33 ± 2.42 a	60.00 ± 5.21 a	12.01 ± 1.33 bAB	6.23 ± 0.18
0.04	100.0 ± 0.00 a	100.0 ± 0.00 a	86.67 ± 4.34 a	73.33 ± 5.67 a	20.00 ± 2.06 cB	8.99 ± 0.87

Note: Data in table were corrected relative to the control. Means followed by same letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level (LSD test).

2.2 氟虫腈对二化螟幼虫持续毒性的作用规律

4 龄二化螟幼虫经不同浓度氟虫腈点滴处理后,其各虫态的死亡率、体重增长率以及化蛹情况等见表 2。数据表明,当氟虫腈浓度为 0.005 g/L 时,幼虫发育至 5 龄时死亡率达到最大,至 6 龄时仍有部分死亡,并且各虫态的体重增长率均相应地显著低于对照;而当氟虫腈浓度为 0.04 g/L 时,幼虫处理后 24 h 内死亡率达到最大,至 5 龄时全部死亡,幼虫的体重增长率较低,5 龄幼虫的体重

甚至低于试虫的初始体重。另外,当氟虫腈浓度为 0.02 或 0.01 g/L 时,4 龄或 5 龄幼虫的体重增长率明显高于对照,表明氟虫腈对幼虫体重的增长具有一定的促进作用,这可能与幼虫对药剂的适应性生理反应有关。

试验还表明,经药剂处理后,所有存活试虫均能化蛹,但蛹重随药剂浓度升高而逐渐降低,这可能是导致成虫产卵率降低的原因之一。

Table 2 Developmental response of the fourth and subsequent instar larvae of *Chilo suppressalis* to various concentrations of fipronil by topical application

Concentration (g/L)	4 th instar larvae		~ 5 th instar larvae		~ 6 th instar larvae		Pupae	
	Mortality (%)	Rate of weight increase (%)	Mortality (%)	Rate of weight increase (%)	Mortality (%)	Rate of weight increase (%)	Rate of pupation (%)	Weight of pupae
Control	/	32.92 b	/	228.02 b	/	688.38 a	/	57.59 a
0.005	0	29.56 c	40	208.72 c	10	676.10 ab	50	51.38 b
0.01	20	29.01 c	40	339.28 a	10	657.90 b	30	46.72 c
0.02	40	34.82 a	50	74.71 d	10	NT	NT	NT
0.04	70	13.56 d	30	-2.03	0	NT	NT	NT

Note: All data in table were average values which were relative to the control. NT indicated no insect existing. Means followed by same letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level (LSD test).

2.3 氟虫腈对二化螟体内解毒酶系的诱导效应

2.3.1 羧酸酯酶 亚致死剂量(0.0015 g/L)氟虫腈对 4 龄二化螟幼虫体内羧酸酯酶(CarE)的活

性具有明显的诱导作用。由图 1 可以看出,处理后 12 h 内,CarE 活性的变化规律与对照基本相似,但明显高于对照,处理幼虫体内 CarE 比活力

和对照的比值约为 1.28 左右; 24 h 时, 对照试虫进入 5 龄期, 其体内 CarE 的活性显著上升, 之后又呈现出逐渐下降的趋势, 但此时经亚致死剂量氟虫腈处理的幼虫体内 CarE 活性未见显著变化。结果表明, 亚致死剂量氟虫腈对二化螟幼虫体内 CarE 的诱导作用具有明显的时间效应。

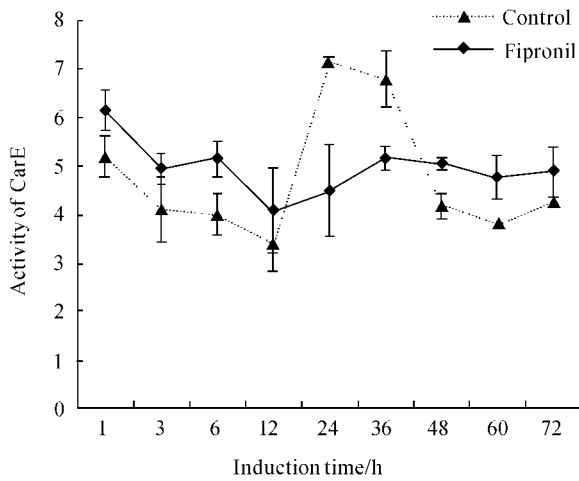


Fig. 1 Induction of CarE in *Chilo suppressalis* treated by fipronil with sublethal doses

Unit of specific activity for CarE: $OD_{450} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro}$

2.3.2 谷胱甘肽-S转移酶 亚致死剂量氟虫腈对 4 龄二化螟幼虫体内 GSTs 活性的诱导作用仅在处理后 3 h 内较为显著, 与对照 GSTs 比活力的比值约为 1.49 左右, 结果见图 2。之后的 6~72 h 内, 经药剂处理的幼虫体内 GSTs 比活力的变化趋势与对照基本相似, 尽管活性的变化程度稍有差别, 但两者之间总的差异不显著。结果表明, 二化螟幼虫体内 GSTs 对亚致死剂量氟虫腈的作用具有一定的适应性。

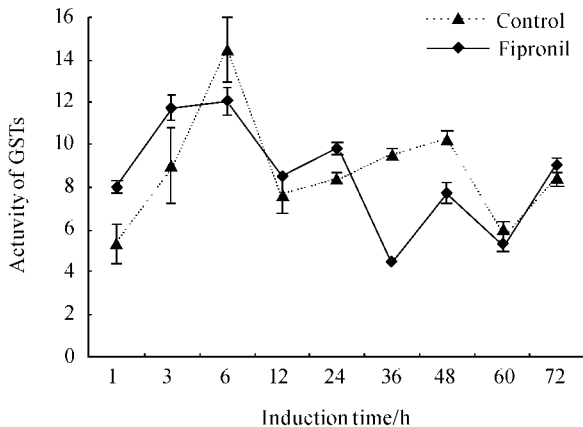


Fig. 2 Induction of GSTs in *Chilo suppressalis* treated by fipronil with sublethal doses

Unit of specific activity for GSTs: $OD_{340} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro}$

2.3.3 多功能氧化酶 亚致死剂量氟虫腈对 4 龄二化螟幼虫体内 MFOs 活性具有显著的诱导作用, 结果见图 3。处理后 72 h 内, 幼虫体内 MFOs 的活性均高于对照, 与对照比活力的比值在 1.01~1.37 之间, 显示出较强的诱导作用。表明 MFOs 活性变化与氟虫腈的作用具有响应关系, 有可能是二化螟体内氟虫腈的重要解毒酶。

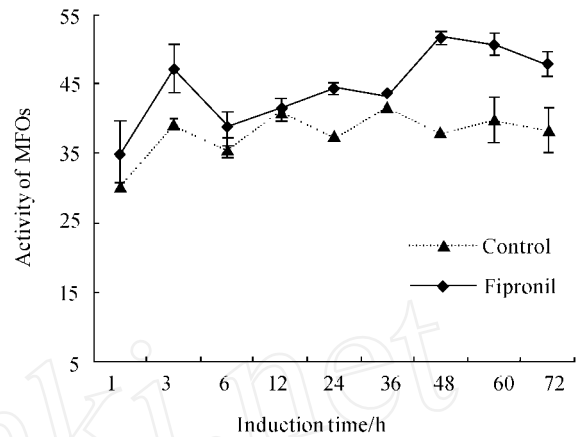


Fig. 3 Induction of MFOs in *Chilo suppressalis* treated by fipronil with sublethal doses

Unit of specific activity for MFOs: $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro}$

3 讨论

氟虫腈作为防治水稻二化螟为害的高效药剂, 其抗药性的产生和演化备受研究者的关注。目前, 在我国长江中下游及东南沿海地区, 二化螟对氟虫腈的抗性虽仍处于低抗范围, 但随着氟虫腈使用量的逐年增加, 合理控制抗性选择压力将是延缓二化螟抗药性发展的重要措施。姜卫华等^[13]报道, 亚致死剂量氟虫腈对二化螟种群的存活率具有持续的影响, 并可使二化螟体内酯酶 (CarE) 活性明显升高, 表明二化螟具有进一步产生和提高抗药性的潜力。

本研究发现, 氟虫腈对二化螟幼虫、蛹和卵的直接毒杀作用差异较大, 对幼虫具有很强的毒杀作用, 对蛹的羽化具有较低的抑制作用, 而对卵孵化则没有抑制作用, 这可能与氟虫腈的表皮渗透能力有关。但是, 亚致死剂量氟虫腈不仅对二化螟种群存活率具有持续的影响, 而且可抑制幼虫的体重增长率, 导致蛹重降低, 表明还将可能会降低成虫的成活率或产卵率。此外, 亚致死剂量氟虫腈对特定龄期幼虫体重的增长具有一定的促进作用, 该作用与幼虫体内解毒酶活性的变化规律

存在一定关系。研究表明,亚致死剂量氟虫腈对二化螟幼虫体内 CarE 的诱导作用具有明显的时间效应,对 GSTs 活性的诱导作用仅在药剂处理后 3 h 内较为显著,在处理后 72 h 内其对幼虫 MFOs 的活性均具有显著的诱导作用。

显然,药剂的亚致死效应虽能提高其对害虫种群的防治效果,但也为害虫抗药性的产生提供了持续的选择压力^[19,20]。有关二化螟对亚致死剂量氟虫腈的适应性机制仍需进一步研究,其结果将有助于阐明二化螟对氟虫腈的抗药性机理。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] LIU Bo (刘波), GAO Xi-wu (高希武), ZHENG Bing-zong (郑炳宗). 抗胆碱酯酶剂亚致死剂量对棉铃虫毒力的影响及对乙酰胆碱酯酶的诱导作用 [J]. *Acta Entomologica Sinica (昆虫学报)*, 2003, 46(6): 691-696.
- [3] Elzen G W. Lethal and sublethal effects of insecticide residues on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthracoridae) and *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) [J]. *J Econ Entomol*, 2001, 94(1): 55-59.
- [4] Moore A, Tabashnik B E, Rethwisch M D. Sublethal effects of fenvalerate on adults of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. *J Econ Entomol*, 1992, 85(5): 1624-1627.
- [5] Haynes K F, Li W G, Baker T C. Control of pink bollworm moth (Lepidoptera: Gelechiidae) with insecticides and pheromones (attracticide): lethal and sublethal effects [J]. *J Econ Entomol*, 1986, 79(6): 1466-1471.
- [6] Clark D C, Haynes K F. Sublethal effects chlordane on chemical communication and other reproductive behaviors in the female cabbage looper moth (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1992, 19: 105-117.
- [7] Hajjor M J, Ford J B. The effect of sublethal doses of cypemethrin on egg laying of mustard beetle *Phaedon cochleariae* (F.) [J]. *Pesticide Science*, 1989, 26: 227-239.
- [8] Durham E W, Siegfried B D, Scharl M E. In vivo and in vitro metabolism of fipronil by larvae of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* [J]. *PestManag Sci*, 2002, 58: 799-804.
- [9] Ikeda T, Zhao X, Salgado V, et al. Fipronil block of glutamate-activated chloride currents in cockroach neurons [J]. *Toxicol Soc*, 2003, 72: 310-315.
- [10] Ikeda T, Nagata K, Kono Y, et al. Fipronil modulation of GABAA receptor single-channel currents [J]. *PestManag Sci*, 2004, 60: 487-492.
- [11] Colliot F, Kukorowski K A, Hakens D W, et al. Fipronil: A new soil and foliar broad spectrum insecticide [A]. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference—Pests and Diseases [C]. British Crop Protection Council, UK, 1992. 29-34.*
- [12] CAO Ming-zhang (曹明章), SHEN Jin-liang (沈晋良), ZHANG Jin-zhen (张金振), et al. 二化螟抗药性监测和对三唑磷抗性的遗传分析 [J]. *Chin J Rice Sci (中国水稻科学)*, 2004, 18(1): 73-79.
- [13] JIANG Wei-hua (姜卫华), HAN Zhao-jun (韩召军), ZHANG Guo-hua (张国华). 氟虫腈对二化螟抗、感种群的亚致死效应 [J]. *Nanjing Agric Univ (南京农业大学学报)*, 2004, 27(2): 51-54.
- [14] SHANG Zhi-zhen (尚稚珍), WANG Yin-shu (王银淑), ZOU Yong-hua (邹永华). 二化螟饲养方法的研究 [J]. *Acta Entomologica Sinica (昆虫学报)*, 1979, 22(2): 164-167.
- [15] Han Z J, Moores G D, Jan D, et al. Association between biochemical marks and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphisgossypii glover* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1998, 62(3): 164-171.
- [16] Kao C H, Fu C, Sum C N. Parathion and methyl parathion resistance in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1989, 82: 1299-1304.
- [17] Yang Y, Wu Y, Chen S, et al. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34: 763-773.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [19] Chaton P F, Ravanel P, Meyran J C, et al. The toxicological effects and bioaccumulation of fipronil in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* in aqueous medium [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2001, 69: 183-188.
- [20] Reidy G F, Rose H A, Visetson S, et al. Increased glutathione-S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistance strain of *Tribolium castaneum* (Herbst) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1990, 36: 269-276.

(Ed. TANG J)