

不同食料对甜菜夜蛾药剂敏感性及其解毒酶活性的影响

吴承春^{**}, 王沫^{*}

(华中农业大学 植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 甜菜夜蛾取食不同食料作物以后, 对灭多威、辛硫磷和溴氰菊酯的敏感性均有不同程度的变化。解毒酶活性测定表明, 不同食料对甜菜夜蛾3龄幼虫的多功能氧化酶(MFO)的脱甲基作用和羧酸酯酶(CarE)的活性有一定的诱导作用, 和人工饲料相比, 具有显著性差异。而羧酸酯酶动力学研究表明, 几种食料作物对甜菜夜蛾羧酸酯酶底物亲和力(K_m)的影响差异不显著。

关键词: 甜菜夜蛾; 食料; 药剂敏感性; 解毒酶

中图分类号: S435.663; S481.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2003)01-0056-05

许多寄主植物组织内含有某些在质和量上不同的次生性物质, 在植物和昆虫的关系中, 植物次生性物质可能通过影响昆虫的取食和生长发育而抵御昆虫的侵害, 另一方面, 昆虫又能不断地适应植物体中的有毒物质, 并发展为避毒、解毒等生理机制^[1]。当多食性害虫取食各种寄主时, 害虫为维持本身生命的需要, 对不适应自己生长发育的寄主植物, 昆虫体内的酶系统会产生明显的改变, 从而引起昆虫对药剂敏感性的变化。而外源物苯巴比妥也可以诱导酶活性的变化^[2]。

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 是一种多食性害虫, 抗药性很强, 近几年来已上升为很重要的蔬菜害虫, 且难以防治^[3]。针对甜菜夜蛾目前的抗性及其食性特点, 作者从生物测定和生化的角度, 初步探讨了甜菜夜蛾取食不同食料后对药剂的敏感性及部分解毒酶活性的变化。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及寄主植物

室内饲养多年的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 敏感品系, 在 27 ± 1 、相对湿度 70% 左右、L/D=14/10 的条件下饲养, 饲养方法参照李广宏等^[4]的方法, 初孵幼虫用寄主植物嫩叶片于室内同等条件饲养至实验所需龄期。供试寄主植物包括棉花 *Gossypium hirsutum* L.、辣椒 *Gapsium frutescens* L.、番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill、豇豆 *Vigna sesquipedalis* Wight、玉米 *Zea mays* L.、白菜 *B rassic a campestris* L. ssp. 红菜薹 (Red bolt)、菠菜 *Spinacia oleracea* L.、萝卜 *Raphanus sativus* L. 等, 均为自然条件下生长, 未经任何药剂处理。

1.2 供试药剂

1.2.1 杀虫剂 98% 灭多威 (methomyl) 原粉 (江苏惠山农药厂); 88% 辛硫磷 (phoxin) 原油 (连云港第二农药厂); 98% 溴氰菊酯 (deltamethrin) 原粉 (原法国 Roussel Uclaf 公司)。

作者简介: 王沫 (1956-), 男, 湖北汉川人, 硕士, 副教授, 主要从事农药及药理方面的研究

^{**} 现工作单位: 华中农业大学科研处

基金项目: 湖北省“九五”科技攻关项目 (961P1103) 资助

1.2.2 主要生化试剂 考马斯亮蓝 G-250、对硝基苯甲醚(PNA)和牛血清蛋白(BSA)(Fluka 公司生产); α -萘酚(上海化学试剂总厂所属上海试剂三厂); 醋酸- α -萘酯(α -NA)和固蓝 B 盐(上海化学试剂总厂所属上海试剂一厂生产); 十二烷基硫酸钠(SDS)和辅酶 II (β -NADPH)(Sigma 公司产品)。

1.3 实验方法

1.3.1 毒力测定 参照联合国粮农组织(FAO)推荐的点滴法^[5]。用丙酮配制成 5~7 个浓度(单位: mg/mL), 选择大小一致的 3 龄幼虫, 以 0.09 μ L 毛细管点滴器(南京农业大学植保系制作)将药液点滴于试虫前胸背板上, 每个浓度 10 头虫, 重复 3 次, 以丙酮作对照, 24 h 后检查结果, 所得数据输入 Qbasic 程序^[6], 进行统计分析。幼虫死亡标准: 以物触其幼虫体的任何部位, 幼虫都不产生反应者为死亡。

单剂量药剂对甜菜夜蛾的死亡率测定: 以各药剂的一个剂量, 用点滴法测定 3 龄幼虫每个处理 50~73 头, 重复 3 次, 比较死亡率大小, 死亡标准同上。

1.3.2 酯酶活性测定 参照文献[7]的方法, 取 5 mL 3×10^{-4} mol/L α -NA 底物(内含有 0.2 mL 1×10^{-3} mol/L 的毒扁豆碱液)、1 mL 酶液摇匀, 以 0.04 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液作对照, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴温育 30 min 后, 立即加入显色剂摇匀(显色剂为 1% 固蓝 B 盐和 5% SDS 于用前以体积比 2:5 混合配成), 显色 0.5 h, 待出现稳定的蓝绿色后, 在 755B 型紫外可见分光光度计上于 600 nm 处测定 OD 值。用 α -萘酚配制几个浓度梯度, 制作标准曲线来定量反应生成物的量, 以每分钟每毫克蛋白酶催化底物所生成的产物浓度表示酶的活性。以不同底物浓度进行羧酸酯酶动力学测定。

1.3.3 多功能氧化酶的脱甲基作用 参照 Hansen 和 Hodgson^[8]方法, 反应总体积为 3 mL (1 mL 酶液, 1 mL 2×10^{-3} mol/L 底物 PNA 和 0.1 mL 0.5 mmol/L NADPH, 0.9 mL 0.1 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液)。37 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后, 加入 1 mL 1 mol/L HCl 终止反应, 用 5 mL 三氯甲烷萃取, 去水相; 再用 3 mL 0.5 mol/L NaOH 反萃取, 取 NaOH 水相, 于 400 nm 处比色。以不加 NADPH 为对照, 据对硝基苯酚 NaOH 液的摩尔系数为 2.008×10^4 (mol \cdot L $^{-1}$) $^{-1}$ \cdot cm $^{-1}$ 计算产物含量。

1.3.4 蛋白质含量的测定 参照 Bradford 的考马斯亮蓝法^[9]。

2 结果与分析

2.1 取食不同食料的甜菜夜蛾 3 龄幼虫对药剂的敏感性

采用点滴法, 测定取食不同食料的甜菜夜蛾 3 龄幼虫对药剂的敏感性, 结果见表 1 和表 2。由表 1 可以看出, 取食不同食料的甜菜夜蛾 3 龄幼虫对灭多威的敏感性(以 LD₅₀ 值比较)不一样, 其中, 取食棉花的敏感性最大, LD₅₀ 值只有 0.0416 μ g/头, 和人工饲料饲养幼虫的 LD₅₀ 相比, 只有后者的 0.32 倍。而取食玉米者的敏感性最小, 其 LD₅₀ 是取食人工饲料者的 5.54 倍, 和取食棉花者的 LD₅₀ 相差 17.3 倍。

从表 2 可以看出, 对用几种常见蔬菜[白菜(Pok-choi)、红菜薹(Red bolt)、菠菜(Spinach)和萝卜(Radish)]以及混有质量分数为 0.5% 苯巴比妥的人工饲料饲养的甜菜夜蛾 3 龄幼虫, 以 3 种药剂进行毒力测定(本试验只使用一个浓度, 24 h 后计算死亡率)。结果发现: 幼虫对辛硫磷的敏感性变化不大, 同一剂量死亡率均在 50.7% (白菜)~65% (红菜薹)之间; 对灭多威的敏感性, 以取食菠菜的较敏感, 死亡率最高, 达 93.5%, 而最低的为取食白菜者, 死亡率仅为

58.0%;对溴氰菊酯的敏感性,以取食白菜的最为敏感,死亡率高达89.8%,而最不敏感的为取食红菜薹者,死亡率仅48.2%。再者,甜菜夜蛾取食含有0.5%苯巴比妥的人工饲料后,除对灭多威死亡率上升外,对辛硫磷、溴氰菊酯的死亡率均有下降,同一剂量下前者下降41.8%,后者下降14.5%。

Table 1 Susceptibility of the 3rd instar larvae of the beet amywom fed on different diets to methomyl

Host plants	LD ^{-P}	LD ₅₀ /μg · larva ⁻¹	Q 95 FL /μg · larva ⁻¹	Ratio
Artificial diet	Y = 6.1435 + 1.2898X	0.1298	0.067~0.251	1.00
Cotton	Y = 5.7549 + 0.5465X	0.0416	0.010~0.179	0.32
Cap sicum	Y = 7.2309 + 1.7587X	0.0539	0.037~0.078	0.42
Tom ato	Y = 6.2408 + 1.8418X	0.2120	0.157~0.287	1.63
Cowpeas	Y = 5.5538 + 1.7548X	0.4835	0.331~0.705	3.72
Corn	Y = 5.4363 + 3.0425X	0.7188	0.553~0.935	5.54

Table 2 Susceptibility of the 3rd instar larvae of the beet amywom fed on different diets to insecticides*

Insec- ticide	Concen- tration /mg · mL ⁻¹	Artificial diets		Pok-choi		Red bolt		Spinach		Radish		Phenobarbital	
		N ¹⁾	M ²⁾	N	M	N	M	N	M	N	M	N	M
phoxin	1.5	60	53.5 ± 7.7	73	50.7 ± 2.1	60	65.0 ± 1.7	—	—	62	53.2 ± 0.1	60	11.7 ± 5.0
methomyl	4.7	60	85.0 ± 1.7	50	58.0 ± 0.3	61	67.2 ± 0.5	61	93.5 ± 3.2	51	82.2 ± 1.2	60	100
delta methrin	0.044	60	81.7 ± 1.7	50	89.8 ± 6.5	62	48.2 ± 3.4	—	—	51	86.3 ± 1.2	61	67.2 ± 3.9

* Topical application dose: 0.09 μL; ¹⁾N: stand for the number of larvae; ²⁾M: stand for mortality (%)

2.2 取食不同食料的甜菜夜蛾体内解毒酶活性的比较

通过对取食不同食料的甜菜夜蛾3龄幼虫体内多功能氧化酶的脱甲基作用及羧酸酯酶活性的测定,结果显示:和人工饲料相比,取食不同食料的甜菜夜蛾3龄幼虫体内多功能氧化酶的脱甲基作用均有所增加,最大相差倍数达3.5倍。而取食不同食料的甜菜夜蛾3龄幼虫体内羧酸酯酶活性大小差异不大,但部分处理也存在显著性差异(结果见表3)。

Table 3 Comparison of enzyme activity between 3rd instar larvae of the beet amywom fed vegetables

Host plants	MFO O-demethylation			Carboxylesterase		
	Activity*	Ratio	α _{0.05} **	Activity	Ratio	α _{0.05}
Artificial diet	0.177 ± 0.016	1.00	a	153.62 ± 4.32	1.00	c
Phenobarbital	0.262 ± 0.016	1.48	b	—	—	—
Red bolt	0.279 ± 0.019	1.58	b	123.28 ± 4.13	0.80	b
Cabbage	0.284 ± 0.005	1.60	b	107.01 ± 1.10	0.70	a
Radish	0.358 ± 0.021	2.02	c	158.75 ± 2.31	1.03	c
Pak-choi	0.593 ± 0.015	3.35	d	132.16 ± 5.51	0.86	b

* Unit: μmol · L⁻¹ · min⁻¹ · (mg Pro)⁻¹. ** The result is the mean (±SE) of three replica. Duncan test: α = 0.05. The same as in the following table

2.3 不同食料对甜菜夜蛾羧酸酯酶的底物亲和力的影响

以不同底物浓度梯度测定羧酸酯酶对底物 α -NA 亲和力的影响, 结果(见表 4)显示, 取食不同食料的甜菜夜蛾的羧酸酯酶与其底物的亲和力变化不大, 其对底物的米氏常数(K_m)差异不显著。表明: 不同食料对甜菜夜蛾的羧酸酯酶的活性影响可能是由于量上的不同而造成的, 而未发生质的变化。

Table 4 Mensuration on the kinetics of CarE in the beet am ywom fed on different vegetables

Host plants	K_m Constant/ $\times 10^{-4}$ mol \cdot L $^{-1}$	Significance ($\alpha_{0.05}$)
Cabbage	2.15 \pm 0.06	a
Artificial diet	2.26 \pm 0.13	a
Pak-choi	2.29 \pm 0.19	a
Spinach	2.49 \pm 0.04	a

3 讨论

本研究结果显示, 取食不同的食料后, 甜菜夜蛾对药剂的敏感性会相应的发生变化。而从取食不同食料的甜菜夜蛾单剂量死亡率和解毒酶活性的差异情况比较来看, 食料、毒力水平、解毒酶这三者之间可能存在一定的内在联系。根据取食不同寄主(表 1 中主要是大田作物)以后甜菜夜蛾对灭多威的敏感性变化情况(LD₅₀值的差异), 作者正试图从生化的角度来分析取食相应寄主后甜菜夜蛾解毒酶活性的变化规律, 以期获悉寄主食料引起甜菜夜蛾对灭多威敏感性变化的内在因素。

本研究所选用的食料作物都是甜菜夜蛾经常危害的作物, 由于这些作物可能含有各种在质和量上都存在差异的植物次生性代谢物质, 甜菜夜蛾取食以后, 体内的解毒酶系可能会受到一定程度的影响, 从羧酸酯酶的动力学研究可以看出, 食料寄主对甜菜夜蛾羧酸酯酶的影响可能只是在量上的差异。苯巴比妥及寄主食料对甜菜夜蛾的多功能氧化酶的活性有诱导作用, 和人工饲料相比, 差异显著, 这可能是其影响甜菜夜蛾对药剂敏感性的因素之一。

甜菜夜蛾因取食不同食料作物后, 对药剂的敏感性不一样的事实, 在甜菜夜蛾综合治理上具有重要的实践指导意义。戴淑慧等^[10]通过观察报道, 豇豆 Cowpea 和雍菜或生菜 Lettuce 间套作, 豇豆苗上的幼虫比没套种时减少了 55% ~ 59%。刘效明等^[11]根据调查发现, 棉田内种植辣椒, 辣椒上的甜菜夜蛾产卵量是棉花上的 4.5 倍; 绿豆和棉花套作, 绿豆受害也明显重于棉花。所以, 人们可以根据甜菜夜蛾的食性特点, 结合甜菜夜蛾因取食不同寄主食料后对药剂敏感性不同的现象, 从寄主、昆虫和药剂三者之间的关系研究甜菜夜蛾抗性的发展, 合理进行作物布局, 减少药剂用量和使用的盲目性, 有效进行综合治理, 这对延缓甜菜夜蛾抗性不失为一种有效的途径。

参考文献:

[1] 钦俊德 昆虫与植物的关系——论昆虫与植物相互作用及其演化 [M] 北京: 科学出版社,

1987. 152-170

- [2] Ottea J A, Plapp F W. Induction of glutathiones-aryl transferase by phenobarbital in the house fly [J]. *Pestic Biochem Physiol* 1981, 15: 10-13
- [3] 苏建亚 甜菜夜蛾的迁飞及在我国的发生 [J]. 昆虫知识, 1998, 35(1): 55-57.
- [4] 李广宏, 陈其津, 庞义 甜菜夜蛾人工饲料的研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(4): 1-5
- [5] 唐振华 昆虫抗药性及其治理 [M]. 北京: 农业出版社, 1993 120-122
- [6] 张宗炳 杀虫剂的毒力测定原理·方法·应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1988 388-391.
- [7] Aspre V K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method [J]. *J Insect Physiol*, 1962, 8: 401-410
- [8] Hansen L G, Hodgson E. Biochemical characteristics of insect microsomes: *N*- and *O*-demethylation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1971, 20: 1569-1678
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [10] 戴淑慧, 杨亚萍 甜菜夜蛾的生物学特性及防治 [J]. 植物保护, 1993, 19(2): 20-21.
- [11] 刘效明, 凌万开, 熊桂和, 等 甜菜夜蛾生物学特性及防治技术 [J]. 植物保护, 1995, 21(6): 29-30

Effect of Different Diets on the Susceptibility of Insecticides and the Activity of Detoxifying Enzymes in the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*

WU Cheng-chun, WANG Mo*

(College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The susceptibility of the beet armyworm to methomyl, phoxin and deltamethrin, was various because of its feeding with different diets. Studies on detoxifying enzymes activities showed that the *o*-demethylation of MFO and activity of CarE in the 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua*, could be induced by different diets, and indicated that the K_m value of CarE in the larvae reared on different diets were not distinctly different from that of the control.

Key words: *Spodoptera exigua*; different diets; susceptibility of insecticides; detoxifying enzymes