

解毒酶系在小菜蛾对阿维菌素抗性中的作用

吴青君^{1*} 张文吉² 张友军¹ 徐宝云¹ 朱国仁¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081) (² 中国农业大学应用化学学院, 北京 100094)

摘要 对阿维菌素敏感 (ABM-S) 和抗性 (ABM-R) 种群小菜蛾的羧酸酯酶 (CarE)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 和多功能氧化酶 (MFO) O-脱甲基活力进行了比较。结果显示, 除 1~2 龄外, ABM-R 种群的 CarE 活力显著高于 ABM-S 种群, 显著性随幼虫龄期的增长而增大, ABM-R 种群 4 龄末期幼虫的 CarE 比活力为 ABM-S 种群的 2.25 倍。动力学研究表明, 可能是低龄幼虫中酶分子的变构起主要作用, 而随着虫龄增长, 酶分子数量的增加对抗性的作用逐渐增大。从酯酶同工酶等电聚焦电泳得出, ABM-R 种群的 E7、E13 和 E15 同工酶活力显著提高是导致 ABM-R 种群酯酶活力提高的主要原因。ABM-S 和 ABM-R 种群 GST 的活力差异在 1~2 龄期最大, 为 2.09 倍, 随幼虫龄期的增大而降低, 4 龄幼虫期的 GST 无种群差异。未检测到多功能氧化酶的 O-脱甲基活力的种群差异。

关键词 小菜蛾; 阿维菌素; 抗药性; 解毒酶系

有害生物对农用化学物质的抗性是世界公认的难题, 其中害虫的抗药性程度及由此造成的经济损失是最为严重的^[1]。抗性机制中研究最多也最为深入的是生理或生化机制, 即认为抗性昆虫较敏感昆虫降解药剂的能力更强、速度更快。通常降解产物的活性降低或基本无活性, 最终被结合或被快速排泄。与杀虫剂代谢相关的解毒酶系主要包括: 细胞色素 P450 介导的多功能氧化酶 (MFO)、水解酯类和酰胺的酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 和 DDT-脱氯化氢酶。这些代谢变化通常再经过次级反应, 包括代谢产物与糖、氨基酸或硫酸盐基团的结合作用而使化合物的水溶性增强并加快排泄作用。

昆虫的解毒酶是一类异质酶系, 能够代谢大量的内源或外源底物, 酶活性的表达受发育阶段、激素水平、种群、性别、食物种类及食物的质量和环境条件等多种因素的影响^[2]。有关抗性基因的阶段性表达 Maa 和 Terriere 对抗性家蝇^[3], Maruyama 等对抗有机磷的尖音库蚊 *Culex pipiens*^[4], Rose 等^[5]、Goh 等^[6]、Ibrahim^[7] 和 Otea 等^[8] 对抗性烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, Hemingway 和 Callaghan 对抗氯辛硫磷的恶蚋 *Simulium ddam nosum*^[9], Forrester 等^[10]、Glenn 等^[11]、张友军等^[12] 对多抗性棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 做过研究, 但小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 对阿维菌素抗性的表达与生长发育阶段的关系目前尚未见报道。

作者主要对阿维菌素敏感和抗性种群小菜蛾的羧酸酯酶 (CarE)、谷胱甘肽 S-转移酶和多功能氧化酶的活性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 供试小菜蛾

相对敏感种群 (ABM-S): 1990 年采自深圳市田间, 于室内连续饲养, 未接触任何杀虫药

□* 通讯联系人

国家“九五”攻关资助项目 (96-005-01-02)

剂,抗性种群(ABM-R):用阿维菌素对ABM-S种群汰选而得,与ABM-S种群相比,抗性指数为80.71倍。

1.2 供试药剂

牛血清白蛋白(BSA)、乙酸- α -萘酯(α -NA)、乙酸- β -萘酯(β -NA)、 α -萘酚、还原型L-谷胱甘肽、对硝基苯和NADPH(以上药剂均为Sigma公司产品);毒扁豆碱和考马斯亮蓝G-250(Fluka公司产品);固蓝B盐和固蓝RR盐(Farco公司产品);丙烯酰胺、亚甲基双丙烯酰胺(Bis-acrylamide)、过硫酸铵(GBCO公司产品);载体两性电解质(Ampholine)和剥离硅烷(Repel-Silane)(A.P.公司产品);1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)(北京化工厂产品);对硝基苯甲醚(上海试剂厂产品)。

1.3 生化测定方法

1.3.1 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝染色法^[13]。

1.3.2 羧酸酯酶(CarE)活性测定 酶源制备:取不同龄期小菜蛾幼虫[1~2龄30头,3龄20头,4龄初期(24h)15头,4龄末(96h)10头,以下同],用0.04 mol/L pH7.0的磷酸缓冲液(PBS)冰浴匀浆,于4℃下,4 000 r/min离心15 min,取上清液作为酶源。

CarE活力测定:参照Van A speren方法^[14]。取适量稀释后的不同体积酶液,加入0.04 mol/L pH7.0的PBS 0.5 mL,再加入3 mmol/L的 α -NA底物(含 10^{-6} mol/L毒扁豆碱)5.0 mL,混匀后于37℃恒温水浴中反应30 min,然后加入1.0 mL显色液(1%固蓝B盐溶液+5%十二烷基硫酸钠溶液=2:5),摇匀后静置30 min,于600 nm处比色。以 α -NA作标准曲线,以所加酶量为横坐标,OD值为纵坐标,计算每毫升酶液生成的 α -NA,测定酶源蛋白质含量($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),然后计算出羧酸酯酶的活力。

CarE动力学常数(K_m 和 V_{max})的测定:测定7个底物浓度下酶反应的初速度,以双倒数作图法求出米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})。

1.3.3 酯酶同工酶的聚丙烯酰胺等电聚焦电泳 参照张龙翔等方法^[15]。

酶液制备:取小菜蛾4龄幼虫(2~3 mg/头),用0.04 mol/L pH7.0的PBS冰浴匀浆,于4℃下,10 000 r/min离心15 min,取上清液作为酶源。

电泳时将电极板的正负电极压在滤纸条上,盖上安全罩,接通冷凝水。首先在电压800 V、电流40 mA条件下预电泳30 min,然后将电压升至2 000 V,电流设置在20 mA,电泳约2 h。

1.3.4 谷胱甘肽S-转移酶(GST)活性测定 酶源制备:取不同龄期小菜蛾幼虫,用0.06 mol/L pH7.0的PBS(含2 mmol/L EDTA)冰浴匀浆,然后于4℃下,4 000 r/min离心30 min,上清液作为酶源。

GST活力测定,参照姜家良等方法^[16]。于UV-300型分光光度计340 nm处,测定记录5 min内OD变化值,重复4次。测定蛋白质含量,计算GST的比活力。

1.3.5 多功能氧化酶O-脱甲基活性测定 酶液制备:取4龄幼虫,以0.1 mol/L pH7.8的Tris-HCl缓冲液冰浴匀浆,于4℃下15 000 r/min离心30 min,取上清液作为酶源。

MFO O-脱甲基活性测定参照Shang^[17]和袁家^[18]方法。

2 结果与分析

2.1 羧酸酯酶

CarE是B-酯酶,又称脂族酯酶,主要通过两种方式起作用:一种方式是酯酶分子发生变

构而增加对底物的亲和力; 另一种方式是酯酶基因的过量表达, 通过合成大量的酶蛋白而增加与杀虫剂的结合, 从而降低或阻断药剂到达作用位点的能力。以每 mg 蛋白表示 CarE 活力, ABM-S 和 ABM-R 种群幼虫不同发育龄期 CarE 的活力比较见表 1。

Table 1 Comparison of carboxylesterase activities and kinetic constants at different instars of the abamectin-susceptible and -resistant strains of *P. xylostella*

Instar	Strain	Specific activity		K_m		V_{max}	
		$/\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{pro}\cdot\text{min}^{-1}$	R/S	$/10^{-3}\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	R/S	$/\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{pro}\cdot\text{min}^{-1}$	R/S
1~ 2	ABM-S	4 7166 ± 0 0258		1 1557		1 0096	
	ABM-R	6 0567 ± 0 0145	1. 28	0 3441	0 30*	0 4031	0 40*
3	ABM-S	3 0472 ± 0 0360		0 4150		0 2821	
	ABM-R	4 3399 ± 0 0345	1. 42*	0 1530	0 37*	0 2915	1. 03
4(24h)	ABM-S	2 5641 ± 0 0026		0 4482		0 2672	
	ABM-R	3 8983 ± 0 0017	1. 52*	0 2801	0 63*	0 3785	1. 42*
4(96h)	ABM-S	7 0452 ± 0 0175		0 6213		0 5361	
	ABM-R	15 8850 ± 0 0183	2 25*	0 5336	0 86	1 4454	2 70*

* Indicates significant difference at 0.05 level. The same as below.

从表 1 可以看出, 除 1~ 2 龄期外, ABM-R 种群的 CarE 活力均显著高于 ABM-S 种群, 且差异性随幼虫龄期的增长而增大, ABM-R 种群老龄幼虫的 CarE 比活力为 ABM-S 种群的 2.25 倍。比较两种群的 K_m 和 V_{max} 可以看出, K_m 值的种群差异随虫龄的增长而缩小, 而 V_{max} 值的差异却逐渐增大。1~ 2 龄幼虫, ABM-R 种群的 K_m 值仅为 ABM-S 种群的 0.30 倍, 但 V_{max} 值也仅为后者的 0.40 倍, 总体表现为 1~ 2 龄期 CarE 活性无种群差异; 3 龄幼虫, V_{max} 值没有显著差异, 但 ABM-R 种群的 K_m 值是 ABM-S 种群的 0.37 倍, 则 3 龄幼虫 CarE 的种群差异主要因 K_m 值的不同所致; 24 h 4 龄幼虫 ABM-R 种群的 K_m 值显著低于 ABM-S 种群, V_{max} 值也为后者的 1.42 倍, 二者综合作用结果为抗性种群 4 龄幼虫的 CarE 活力显著高于相对敏感种群, 为 ABM-S 种群的 1.52 倍; 老龄幼虫 ABM-R 种群的 V_{max} 值是 ABM-S 种群的 2.70 倍, 但 K_m 值无显著差异。以上结果说明, 抗性种群羧酸酯酶活性的增加在幼虫不同发育龄期的生理反应机制不同, 低龄幼虫酶分子的变构可能起主要作用, 而随着虫龄增长, 酶分子数量的增加对抗性的作用逐渐增大。

2.2 酯酶同工酶等电聚焦电泳

根据酯酶同工酶扫描图谱(见图 1) 峰面积得出, ABM-R 种群的全酯酶活力高于 ABM-S 种群, 为 ABM-S 种群的 1.28 倍。其中 ABM-R 种群的 E7、E13 和 E15 的活力提高显著, 分别为 ABM-S 种群相应酶带 E10、E17 和 E20 的 1.70、2.56 和 2.94 倍, 是导致 ABM-R 种群酯酶活性提高的主要原因。同时可以看出, ABM-R 种群的同工酶带的显著减少, 可能是因为通过杀虫剂的选择, 敏感种群的酶从杂合形式逐步被淘汰为“纯合酶”或趋向于“纯合”。

2.3 谷胱甘肽 S-转移酶

从表 2 可以看出, ABM-S 和 ABM-R 种群 GST 的活力差异在 1~ 2 龄期为最大, 随幼虫龄期的增大而降低, 4 龄幼虫期的 GST 无种群差异。低龄幼虫期, 即 1~ 2 龄和 3 龄期, ABM-R

种群的 GST 活力显著高于 ABM-S 种群, 分别为 ABM-S 种群的 2.09 和 1.48 倍。

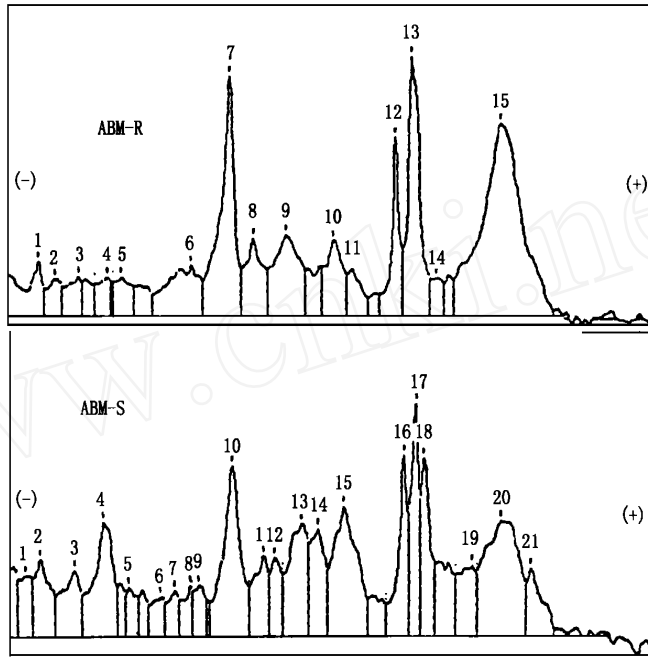


Fig. 1 Scanning zymograms of esterase isozyme with isoelectric focusing electrophoresis (pH 3.5~10)

Table 2 Comparison of glutathione S-transferase activity between different instars of the abamectin-susceptible and -resistant strains of *P. xylostella*

Instar	Strain	Specific activity/ $\text{OD} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro} \cdot (5 \text{min})^{-1}$	R/S
1~2	ABM-S	1.5091 ± 0.1354	
	ABM-R	3.1473 ± 0.2369	2.09*
3	ABM-S	1.6356 ± 0.0824	
	ABM-R	2.4191 ± 0.0883	1.48*
4(24h)	ABM-S	3.1922 ± 0.2241	
	ABM-R	3.3312 ± 0.1863	1.04
4(96h)	ABM-S	6.3949 ± 0.1306	
	ABM-R	6.5942 ± 0.1826	1.03

2.4 多功能氧化酶

因虫量原因, 作者只对 4 龄幼虫的 MFO 活性进行了比较。从表 3 中可以看出, ABM-S 和 ABM-R 种群的多功能氧化酶的 *o*-脱甲基活力分别为 0.0653 和 0.0703 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro} \cdot \text{min}^{-1}$, 无显著差异, 其原因尚不明确, 讨论中对此进行了进一步的分析。

Table 3 Comparison of *O*-demethylase activity between abamectin-susceptible and -resistant strains of *P. xylostella*

Strain	Specific activity/ $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro} \cdot \text{min}^{-1}$	R/S
ABM -S	0.0653 \pm 0.0043	
ABM -R	0.0703 \pm 0.0055	1.08

3 讨论

室内抗性汰选通常产生多基因抗性,这是因为抗性选育过程中,每次处理后均保留少数存活个体,每个微效基因的逐代积累最终形成多基因遗传的抗性^[19]。本研究结果表明小菜蛾对阿维菌素的抗性与羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶的活性增强有一定关系,酶活性的表达与昆虫的生长发育呈一定的相关性,不同酶系对抗性的贡献与虫龄亦有一定关联。在低龄幼虫期可能是 GST 对抗性的贡献较大,而随着龄期增长,羧酸酯酶逐渐起主要作用。

细胞色素 P450 依赖的微粒体多功能氧化酶是具有极广泛底物的同工酶系,它对内源和外源化合物如各种杀虫剂和有害化合物的氧化代谢起着重要作用,在昆虫抗药性和选择毒性及昆虫对寄主植物的适应性等方面也起着重要作用。本研究中敏感和抗性种群的多功能氧化酶 *O*-脱甲基活力无种群差异,与离体测定的 PB 有明显增效作用不一致。这种现象可能是由于: 1) 微粒体氧化酶的多功能性意味着对一种同工酶有作用的增效剂,对其它同工酶可能没有任何作用^[5]; 2) 反过来,因氧化作用而增加的抗性并非总是与各类微粒体氧化作用有关; 3) PB 除能抑制微粒体氧化酶的活性外,对酯酶亦有抑制作用^[20],杀虫剂对昆虫的抗性汰选可以是多种氧化作用的同时增加或是某些反应选择性地增加^[21],而仅从某一种氧化作用如 *O*-脱甲基作用难以反映对特异化合物如阿维菌素的氧化代谢作用; 4) 增效剂 PB 是强亲脂性化合物,它对生物膜也具有一定的作用,可能生物测定中观察到的增效作用是由于 PB 能够促进杀虫剂的穿透作用而造成的^[22]。

参 考 文 献

- Soderlund D. M. . *Chem istry of Plant Protection*, 1997, 13: 23~ 26
- Devorshak C. , Reo R. M. . *Rev. Toxicology*, 1998, 2: 501~ 537
- Maaw W. C. , Terriere L. C. . *Comp. Biochem. Physiol* , 1983, 74 C: 461~ 467
- Maruyama Y. , Yasutom i K. , Ogita Z. I. . *Insect Biochem.* , 1984, 14: 181~ 188
- Rose R. L. , Barbhaiya L. , Roe R. M. *et al. Pestic Biochem. Physiol* , 1995, 51: 178~ 191
- Goh D. K. S. , Anspaugh D. D. , Motoyama N. *et al. Pestic Biochem. Physiol* , 1995, 51: 192~ 204
- Ibrahim S. A. , Ottea J. A. . *Pestic Biochem. Physiol* , 1995, 53: 116~ 128
- Ottea J. A. , Ibrahim S. A. , Younis A. M. *et al. Pestic Biochem. Physiol* , 2000, 66: 20~ 32
- Hemingway J. , Callaghan A. . *Bull Entomol Res* , 1991, 81: 401~ 407
- Forrester N. W. , Cahill M. , Bird L. J. *et al. Bull Entomol Res* , Supplement Series Number . . , 1993, 1: 54~ 61
- Glenn D. C. , Hoffman A. A. , McDonald G. . *J. Econ. Entomol* , 1984, 87: 1165~ 1171

- 12 张友军, 张文吉, 韩熹莱等 昆虫学报, 1997, 40 (3): 247~ 253
- 13 Bradford M. M. . *Anal Biochem.* , 1976, 72: 255~ 260
- 14 Van Asperen K. . *J. Insect Physiol.* , 1962, 8: 401~ 416
- 15 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编 生化实验方法和技术, 北京: 高等教育出版社, 1997: 111~ 116
- 16 姜家良, 陈巧云, 侯能俊等 昆虫学报, 1984, 27 (3): 248~ 253
- 17 Shang C. C. , Soderlund D. M. . *Comp. Biochem. Physiol.* , 1984, 79B: 407~ 411
- 18 袁家骝, 孙耘芹, 冯国蕾等 昆虫学报, 1987, 30 (2): 126~ 132
- 19 Roush R. T. , McKenzie J. A. . *Annu. Rev. Entomol.* , 1987, 32: 361~ 380
- 20 Gunning R. V. , Devonshire A. L. , Moores G. D. . *Pestic Biochem. Physiol.* , 1996, 54: 12~ 23
- 21 McCord E. Jr. , Yu S. J. . *Pestic Biochem. Physiol.* , 1987, 27: 114~ 122
- 22 DeVries D. H. , Geoghiau G. P. . *Biochem. Physiol.* , 1981, 15: 242~ 252

The Role of Detoxification in Abamectin-resistant *Plutella xylostella* (L.)

Wu Qingjun^{1*} Zhang Wenji² Zhang Youjun¹ Xu Baoyun¹ Zhu Guoren¹

⁽¹⁾Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

⁽²⁾College of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Tests were conducted to determine the activity of detoxification enzyme systems, including carboxylesterase (CarE), glutathione S-transferase (GST) and mixed-function oxidase (MFO) in the abamectin-susceptible (ABM-S) and -resistant (ABM-R) strains. There were significant differences in CarE activities at various developmental stages except the first and the second instars between the two strains. The differences increased when the age of instar increased. The CarE specific activity of ABM-R strain at the late fourth instar was 2.25-fold higher than that of the ABM-S strain. Kinetics studies showed that change of CarE molecular play a key role in the earlier instar. Quantitative differences might gradually replace the role within lately instar. Esterase isozyme upon isoelectric focusing electrophores demonstrated that the high levels of total esterase activity in ABM-R was due to the increased activities of E7, E13 and E15 isozymes. The biggest difference of GST activities between ABM-S and ABM-R strain was at earlier stage, which was 2.09-fold. However, the differences reduced with the increase of larval age. And no difference was observed at the late fourth instar. It was unexpected that there was no significant difference in O-demethylase activity of the monooxygenases between the two strains. Four possible reasons were discussed.

Key words *Plutella xylostella*; Abamectin; Resistance; Detoxification