

杀虫剂亚致死剂量对小菜蛾羧酸酯酶的影响

夏冰^{**}, 石泰^{***}, 梁沛, 高希武^{*}

(中国农业大学 植物保护学院, 北京 100094)

摘要: 就阿维菌素和高效氯氰菊酯亚致死剂量对小菜蛾 *Plutella xylostella* L innea 羧酸酯酶 (CarE) 活性的影响进行了研究。用亚致死剂量的阿维菌素和高效氯氰菊酯分别处理阿维菌素敏感和抗性小菜蛾, 使敏感品系 CarE 比活力上升, 抗性品系 CarE 比活力下降。酶动力学研究表明, 两种药剂亚致死剂量处理对小菜蛾 CarE 与底物 α NA 亲和力的影响存在差异。在敏感品系中, 阿维菌素和高效氯氰菊酯处理前后 CarE 的 K_m 值无明显变化; 抗性品系中, 用阿维菌素亚致死剂量处理后, 小菜蛾体内 CarE 的 K_m 值显著高于对照, 即其对 α NA 的亲合力比对照组明显降低, 高效氯氰菊酯处理组 CarE 的 K_m 值与对照相比无明显变化。

关键词: 小菜蛾; 阿维菌素; 高效氯氰菊酯; 亚致死剂量; 羧酸酯酶 (CarE)

中图分类号: Q 965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2002)01-0023-05

杀虫剂施用于田间后, 除了对害虫的直接杀死作用外, 随着时间的推移以及个体接触药量的差异, 对部分试虫还存在亚致死效应。随着人们环境保护意识的增强, 近年来关于杀虫药剂对害虫亚致死效应方面的研究已经很多, 主要包括对害虫生物学、生态行为和生殖力等方面影响的研究^[1-5]。

宏观上, 在杀虫药剂亚致死剂量对害虫抗药性发展的影响方面也做了一些研究, 发现亚致死剂量的药剂对于害虫的抗药性发展有一定的促进作用。如高宗仁等^[6]用亚致死剂量的溴氰菊酯、氧乐果、杀虫脒和三氯杀螨醇等 4 种药剂对朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 连续选择 3 代后发现, 其对这 4 种药剂的敏感度均有不同程度的下降, 且该螨各发育阶段的历期均有不同程度的缩短。Nandihalli 等^[7]研究发现, 溴氰菊酯、氯氰菊酯和氰戊菊酯的亚致死剂量引起的棉蚜再猖獗情况比推荐使用浓度下更为严重。但仅有个别从更深层次研究杀虫药剂亚致死剂量处理对昆虫体内解毒酶影响方面的报道^[8-10]。

小菜蛾一直是蔬菜生产中最难防治的害虫之一。作者就用亚致死剂量阿维菌素 (AVM) 和高效氯氰菊酯处理后不同小菜蛾品系中羧酸酯酶 (CarE) 活性的变化进行了研究, 以期小菜蛾的抗药性治理提供一些理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试虫来源及饲养

阿维菌素抗性品系 (AV-R) 由 1997 年采自河北省宣化田间的宣化种群室内汰选所得, 阿维菌素敏感品系 (XH-S) 由同源的宣化种群在不接触药剂情况下同步饲养所得。室内饲养采用蛭石萝卜苗法^[11]。

基金项目: 国家重大基础研究 973 (G2000016207); 国家自然科学基金资助项目 (29832025 和 39970496)。

作者简介: 高希武 (1958-), 男, 河北唐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫毒理方面的研究

^{**} 南京农业大学本科毕业实习生, ^{***} 河南农业大学本科毕业实习生

1.2 供试试剂 药剂及仪器

91. 2% 阿维菌素(abamectin)原药(北京农业大学新技术开发总公司提供); 5% 高效氯氰菊酯(*beta*-cypemethrin)乳油(山东中石化化工有限公司产品); 乙酸- α -萘酯(α -NA)和乙酸- β -萘酯(β -NA), 化学纯(上海试剂一厂产品); 固蓝 B 盐(Fluka 公司产品); 99% 毒扁豆碱(eserine) (Aldrich 化学公司产品); 曲拉通(Triton X-100) (上海化学试剂采购供应站美国进口分装)。

1.3 生物测定方法

参照 Ismail 和 Wright^[12, 13]的叶片药膜法。取新鲜无农药污染的甘蓝叶片清洗干净后浸于系列浓度的药液中 10 s, 以蒸馏水(含 0.1 mL/L 的 Triton X-100)作对照, 室内晾干后接大小一致的 3 龄幼虫(2~ 3 mg/头), 每个浓度 3 次重复, 每个重复接 10~ 20 头幼虫。48 h 后统计结果。数据用 POLO 软件处理, 计算 LC_{50} 和 LC_{17} 值及毒力回归方程的斜率(b)。

1.4 CarE 残存活性测定

1.4.1 试虫处理 参照 1.3 生物测定方法, 取新鲜无农药污染的甘蓝叶片分别于浓度为 LD_{17} 的 AVM 和高效氯氰菊酯溶液中浸 10 s, 室内晾干, 置于 5 个培养皿中, 各接大小一致的 3 龄幼虫(2~ 3 mg/头) 20 头, 处理 24 h 后将存活的幼虫于 -20℃ 冻存。以蒸馏水处理的叶片接虫为对照。

1.4.2 CarE 残存活性测定 参考高希武等^[14]和李腾武等^[15]方法, 将 1.4.1 处理过的幼虫去头后, 加 pH 7.0, 0.04 mol/L 的磷酸缓冲液匀浆, 所得酶液冰浴待测。以 α -NA 和 β -NA 为底物(其中均含毒扁豆碱 10^{-5} mol/L)。30℃ 水浴中反应 15 min 后加入 1 mL 显色液终止反应, 分别于 600 nm 和 555 nm 测定光密度值。每处理设 3 次重复。

1.4.3 米氏常数(K_m)的测定 取 6 支试管, 各加入 0.2 mL 酶液和 0.8 mL 磷酸缓冲液(pH 7.0, 0.04 mol/L), 再分别加入不同浓度的底物 α -NA, 30℃ 水浴中反应 15 min 后加入 1 mL 显色液终止反应, 于 600 nm 测定光密度值。每处理设 3 次重复。以 pH 7.0, 0.04 mol/L 的磷酸缓冲液为对照。

1.4.4 蛋白质含量测定 参照 Bradford^[16]考马斯亮蓝 G-250 法。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾抗性水平的测定

表 1 显示出敏感品系和抗性品系小菜蛾对 AVM 和高效氯氰菊酯的敏感度。进一步计算得到不同品系不同处理相应的亚致死剂量, 即 LC_{17} 。AVM 和高效氯氰菊酯对敏感品系的亚致死剂量分别为 0.011 mg/L 和 59.792 mg/L; AVM 和高效氯氰菊酯对抗性品系的亚致死剂量分别为 3.255 mg/L 和 313.403 mg/L。以下各实验所用的药剂剂量均为上述相应亚致死剂量。

2.2 不同品系不同处理小菜蛾幼虫 CarE 活性比较

表 2 显示出敏感品系用 AVM 和高效氯氰菊酯处理后, CarE 对 α -NA 和 β -NA 的活性均比对照高, 且在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。抗性品系用上述两种药剂处理后, 其 CarE 对 α -NA 和 β -NA 的活性均比对照低, 其中 AVM 处理组的 CarE 活性最低, 三者均在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。抗性品系对照组 CarE 对 α -NA 和 β -NA 的活性均比敏感品系对照组的高。

Table 1 The susceptibility of diamondback moth to abamectin and *beta*-cypemethrin

Strains [*]	Insecticides	<i>b</i>	LC ₅₀ /mg · L ⁻¹	95% L M
XH-S	abamectin	1.104 ± 0.290	0.032	0.012~ 0.063
	<i>beta</i> -cypemethrin	1.960 ± 0.312	179.375	124.934~ 244.408
AV-R	abamectin	1.478 ± 0.293	9.765	6.423~ 13.884
	<i>beta</i> -cypemethrin	2.398 ± 0.552	940.208	486.926~ 1319.641

^{*}XH-S: abamectin-susceptible strain, AV-R: abamectin-resistant strain

Table 2 Comparison of larvae specific activity of CarE in different diamondback moth strains treated with abamectin and *beta*-cypemethrin

Strains	Treatment	α NA		β NA	
		Specific activity /mOD ₆₀₀ · (mg pro · min) ⁻¹	RR	Specific activity /mOD ₅₅₅ · (mg pro · min) ⁻¹	RR
XH-S	CK	1.326 ± 0.062 a	1.000	1.504 ± 0.038 a	1.000
	abamectin	1.925 ± 0.034 b	1.451	2.057 ± 0.053 b	1.368
	<i>beta</i> -cypemethrin	2.028 ± 0.054 b	1.529	2.078 ± 0.021 b	1.382
AV-R	CK	2.268 ± 0.0367 a	1.000	3.998 ± 0.156 a	1.000
	abamectin	1.149 ± 0.021 b	0.507	1.894 ± 0.036 b	0.474
	<i>beta</i> -cypemethrin	1.779 ± 0.023 c	0.784	3.004 ± 0.035 c	0.751

Note: RR= Specific activity of treated group/Specific activity of CK. Within a column, values sharing a common letter means not significantly different ($P > 0.05$). The same as below.

2.3 不同品系不同处理小菜蛾幼虫 CarE K_m 值的比较

表3为不同品系不同处理小菜蛾幼虫CarE的 K_m 值和 V_{max} 值。敏感品系分别用亚致死剂量的AVM和高效氯氰菊酯处理后,其CarE的 K_m 值与对照组相比无明显差异,而 V_{max} 均高于对照,且在 $\alpha = 0.01$ 水平上存在显著差异,也就是说,其CarE对 α NA的亲合力变化不大,但处理组CarE的比活力却明显高于对照组。这与表2的结果一致。抗性品系只有AVM处理组的 K_m 值显著高于对照组,即其CarE对 α NA的亲合力比对照组有所降低,高效氯氰菊酯处理组的 K_m 值与对照组无明显差异;AVM和高效氯氰菊酯两处理组的 V_{max} 均明显低于对照组。另外,在两个品系中,AVM处理组的 K_m 值均显著高于高效氯氰菊酯处理组。

Table 3 Comparison of K_m and V_{max} value of larvae CarE in different DBM strains treated with abamectin and *beta*-cypemethrin

Strains	Treatment	$K_m/10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	RR	$V_{max}/\text{mOD}_{600} \cdot$ (mg pro · min) ⁻¹	RR
XH-S	CK	3.125 ± 0.319 abc [*]	1.000	3.638 ± 0.283 a [*]	1.000
	abamectin	4.020 ± 0.684 b	1.286	6.269 ± 0.746 b	1.723
	<i>beta</i> -cypemethrin	3.052 ± 0.230 c	0.977	4.760 ± 0.302 c	1.308
AV-R	CK	1.509 ± 0.253 ac	1.000	4.755 ± 0.419 a	1.000
	abamectin	3.091 ± 1.250 b	2.048	2.838 ± 0.757 b	0.597
	<i>beta</i> -cypemethrin	0.949 ± 0.241 c	0.629	2.842 ± 0.327 b	0.598

3 讨论

CarE 是昆虫体内的重要解毒酶系, 研究药剂亚致死剂量对 CarE 的影响是昆虫毒理学的一个重要内容。本研究结果表明, 用 AVM 和高效氯氰菊酯亚致死剂量处理 AVM 敏感小菜蛾品系, 可使其体内 CarE 活性提高, 说明这两种药剂的亚致死剂量对敏感品系小菜蛾的 CarE 有一定诱导作用。两种药剂亚致死剂量处理抗性小菜蛾品系的 CarE 有一定的抑制作用, 这与高希武等^[9]的研究结果基本一致, 他们发现用低剂量的对硫磷、马拉硫磷、倍硫磷、灭多威和溴氰菊酯等处理棉铃虫 48 h 后, 其 CarE 比活力明显降低, 对底物的亲和力则随药剂种类而异。研究还表明, 以亚致死剂量的 AVM 处理抗性小菜蛾品系后, 其 K_m 值显著高于对照组 (为对照组的 2.05 倍), 即其 CarE 对 α -NA 的亲和力比对照组明显降低。高希武等^[10]以 LD_{50} 剂量的对硫磷和灭多威处理棉铃虫 3 龄幼虫 24 和 48 h 后, 发现其 GSTs 的比活力及 GSTs 对底物的亲和力均明显降低。还有研究^[8]表明, 用亚致死剂量的甲基对硫磷和谷硫磷处理一种褐蛉 *M. cramus tasmaniae*, 对其 AChE 的抑制率随杀虫剂浓度的升高而呈指数增长; 而用氯氰菊酯、苯氯威、除虫脲和虫酰肼处理, 对其 AChE 活性则无影响。

关于杀虫剂对害虫亚致死效应的研究, 以往多集中在杀虫剂亚致死剂量对害虫的生理、生殖、发育、种群的内在增长力和拒食效应以及对天敌的生物学等方面^[17-22], 基本上是以昆虫种群的死亡率、繁殖率及生态行为学等方面的参数来评价和评估, 从更深层次的酶动力学及分子水平上对亚致死效应进行的研究国内外还不是很多。而深入研究农药对生态系统的影响, 探讨杀虫药剂亚致死效应的生物化学和分子生物学机制, 对于合理使用杀虫剂、减少其不良副作用及协调生物防治与化学防治的关系将具有积极意义。

参考文献:

- [1] Perveen F. Sublethal effects of chlorfluazuron on reproductivity and viability of *Spodoptera litura* (F) (Lep, Noctuidae) [J]. *J Appl Entomol*, 2000, 124: 5-6
- [2] Laecke K V, Degheele D, Auda M. Effect of a sublethal dose of chitin synthesis inhibitors on *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Parasitica*, 1989, 45: 4, 90-98
- [3] 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.
- [4] Shimada T, Nemoto H. Effects of sublethal concentrations of pemethrin on the fecundity of the diamondback moth [*Plutella xylostella* (L)] [J]. *Proceedings of the Kanto Tosan Plant Protection Society*, 1993, 40: 207-208
- [5] Nemoto H. Mechanism of resurgence of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L) (Lepidoptera: Yponomeutidae) [J]. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 1993, 27: 1, 27-32
- [6] 高宗仁, 李巧丝, 刘孝纯. 杀虫剂对朱砂叶螨某些生物学特性的影响 [J]. *植物保护学报*, 1991, 18(3): 283-287.
- [7] Nandihalli B S, Patil B V, Hugar P. Influence of synthetic pyrethroid usage on aphid resurgence in cotton [J]. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 1992, 5(3): 234-237.
- [8] 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

- [9] 高希武, 赵颖, 王旭, 等. 对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用 [J]. 昆虫学报, 1998, 41(增): 5-10
- [10] 高希武, 董向丽, 郑炳宗, 等. 棉铃虫的谷胱甘肽 S-转移酶(GST): 杀虫药剂和植物次生性物质的诱导与 GST 对杀虫药剂的代谢 [J]. 昆虫学报, 1997, 40(2): 122-125
- [11] 刘传秀, 韩招久, 李凤良, 等. 应用蛭石萝卜苗法室内继代大量繁殖小菜蛾的研究 [J]. 昆虫知识, 1993, 30(6): 341-344
- [12] Ismail F, Wright D J. Cross-resistance between acylurea insect growth regulators in a strain of *Plutella xylostella* (L.). (Lepidoptera: Yponomeutidae) from Malaysia [J]. *Pestic Sci*, 1991, 33: 359-370
- [13] Ismail F, Wright D J. Synergism of teflubenzuron and chlorfluazuron in an acylurea-resistant field strain of *Plutella xylostella* (L.). (Lepidoptera: Yponomeutidae) [J]. *Pestic Sci*, 1992, 34: 221-226
- [14] 高希武, 郑炳宗, 陈仲兵. 小菜蛾羧酸酯酶性质的研究 [J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(Suppl): 122-126
- [15] 李腾武, 高希武, 郑炳宗, 等. 阿维菌素对小菜蛾的抗性选育及其对解毒酶活性的影响 [J]. 昆虫学报, 2000, 43(增): 38-43
- [16] 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
- [17] Nauen R, Koob B, Elbert A. Antifeedant effects of sublethal dosages of imidacloprid on *Bemisia tabaci* [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1998, 88(3): 287-294
- [18] Kerns D L, Stewart S D. Sublethal effects of insecticides on the intrinsic rate of increase of cotton aphid [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2000, 94(1): 41-49
- [19] 古德就, Waag J K. 农药亚致死剂量对小菜蛾及其天敌优姬蜂的影响 [J]. 植物保护学报, 1994, 21(3): 265-268
- [20] 徐学农, 王刚. 杀螨王的亚致死剂量处理桃叶对山楂叶螨雌成螨生殖的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(4): 352-355
- [21] 古德就. 逐药亚致死剂量对优姬蜂交配行为影响的研究 [J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(2): 55-59
- [22] 申继忠, 钱传范. 亚致死剂量苏云金杆菌蜡螟亚种对大蜡螟幼虫呼吸作用的影响 [J]. 生物防治通报, 1994, 10(2): 93-94

Effect of Sublethal Concentration of Insecticides on the Carboxylesterase in Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.)

XIA Bing, SHI Tai, LIANG Pei, GAO Xi-wu*

(Department of Entomology, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Abstract: The sublethal effect of abamectin (AVM) and *beta*-cypemethrin (CPM) on the carboxylesterase (CarE) in diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.) was investigated. The results showed that the specific activity of CarE in DBM increased in abamectin susceptible strain (XH-S) and decreased in abamectin-resistant strain (AV-R) after the treatment with sublethal concentration of AVM and CPM. The effect of AVM and CPM sublethal concentration on the affinity of CarE to α - or β -naphthyl acetate is varied. After treated with AVM and CPM, the K_m value of CarE in XH-S strain showed no distinct difference from that of the control. In the AV-R strain, the K_m value of CarE after treated with AVM is significantly higher than that of the control but no distinct change after treatment with CPM.

Key words: *Plutella xylostella*; sublethal effect; carboxylesterase; abamectin; *beta*-cypemethrin