

甘蓝薄翅蛾对毒死蜱的抗性风险评估 及解毒酶活性研究

曾东强¹, 高 华¹, 李晶晶¹, 徐汉虹²

(1 广西大学农学院, 广西南宁 530005;

2 华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东广州 510642)

摘要:用毒死蜱对甘蓝薄翅蛾 *Crociodolomia pavonana* 的实验种群进行抗性品系的选育。经10代的室内汰选,该种群对毒死蜱的敏感性显著下降,筛选后 F_{10} 的 LD_{50} ($0.4862 \mu\text{g} \cdot \text{头}^{-1}$) 比筛选前 F_0 的 LD_{50} ($0.048 \mu\text{g} \cdot \text{头}^{-1}$) 提高了10.13倍。应用Tabashnik的阈状分析法分析了甘蓝薄翅蛾对毒死蜱的抗性现实遗传力,并对其在毒死蜱不同选择压下的抗性发展速率进行了预测。该虫对毒死蜱的抗性现实遗传力为0.5708,当室内汰选的死亡率为50%~90%时,甘蓝薄翅蛾要获得对毒死蜱的10倍抗性,需要经过5.03~11.13代。酶活力测定结果表明,甘蓝薄翅蛾对毒死蜱的抗性与羧酸酯酶、谷胱甘肽转移酶和多功能氧化酶这3种酶的活性有密切关系。

关键词:甘蓝薄翅蛾; 毒死蜱; 抗性风险评估; 抗性机制

中图分类号:S481.4

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)04-0038-04

Resistance Risk Assessment and Activities of Detoxification Enzymes to Chlorpyrifos in *Crociodolomia pavonana*

ZENG Dong-qiang¹, GAO Hua¹, LI Jing-jing¹, XU Han-hong²

(1 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2 Key Laboratory of Natural Pesticides and Chemical Biology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Continuously selected with chlorpyrifos for 10 generations, the sensitivity of *Crociodolomia pavonana* in the laboratory strain descended prominently. The LD_{50} ($0.4862 \mu\text{g}/\text{larva}$) of F_{10} generation after selection increased to 10.13-fold as compared with the LD_{50} ($0.048 \mu\text{g}/\text{larva}$) of F_0 generation. Based on the method described by Tabashnik (1992), the estimation of realized heritability (h^2) of resistance to chlorpyrifos in *C. pavonana* was 0.5708. It was predicted that the strain would require to spend 5.03 – 11.13 generations to obtain a 10-fold increase in resistance to chlorpyrifos under selective pressure of 50% – 90% mortality for each selective generation. The results of the determination on the activities of detoxification enzymes indicated that the resistance of *C. pavonana* to chlorpyrifos had a close relationship with carboxylesterase (CarBE), glutathione S-transferase (GSTs) and mixed function oxidase (MFO).

Key words: *Crociodolomia pavonana*; chlorpyrifos; resistance risk assessment; resistance mechanism

甘蓝薄翅蛾 *Crociodolomia pavonana* (Fabricius) 属鳞翅目, 螟蛾科, 薄翅蛾亚科 (Evergestiinae), 主要分布在亚洲的东南亚国家和非洲的新几内亚等国家,

其寄主主要为甘蓝和卷心菜类, 在新几内亚和东南亚地区是十字花科蔬菜的重要害虫^[1]。笔者于2003年在广西南宁市安吉蔬菜基地发现该虫为害十字花

收稿日期:2008-05-05

作者简介:曾东强(1962—),男,副教授,硕士,E-mail:zengdq@tom.com

基金项目:广西自然科学基金(桂科基0342002-1)

科蔬菜,并对其生物学特性进行了初步研究^[2]。目前,在生产上化学防治是控制甘蓝薄翅螟发生为害的主要手段,因此,开展该虫的抗药性研究是非常必要的。本文用毒死蜱对甘蓝薄翅螟的实验种群进行抗性品系的选育,测定其不同抗性品系的酶活性,以期了解该虫对毒死蜱的抗性风险及抗性机制,为毒死蜱的科学合理使用,为该虫的抗性治理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

甘蓝薄翅螟 *Crocitolomia pavonana*; 2003年9月在广西南宁市安吉菜区甘蓝上采回幼虫,在室内以甘蓝叶片继代饲养25代以上,建立的实验种群作为相对敏感品系,饲养条件为温度25~28℃,光照14 h/d,日光灯光源。选取健康、大小一致的3龄幼虫供试。

供试药剂:97%毒死蜱原药,广西金燕子农药公司; α -乙酸萘酯,化学纯,上海试剂一厂;十二烷基硫酸钠,上海试剂一厂;考马斯亮蓝G-250、固蓝B盐, Sigma公司;毒扁豆碱, Fluka公司; α -萘酚,化学纯,上海试剂一厂;还原型谷胱甘肽(GSH), Japan进口分装;1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB), Fluka公司;对硝基苯甲醚, Roche公司;还原型辅酶II(NADPH), Roche公司。

1.2 方法

1.2.1 毒力测定方法 参照美国昆虫学会(ESA, 1970)和世界粮农组织(FAO, 1980)推荐的烟夜蛾属 *Heliothis* spp. 害虫抗药性测定的标准方法^[3]。用微量毛细管点滴器(体积为0.087 μ L)将药液点滴处理试虫。分别记录各处理的总虫数和死虫数,计算各处理的死亡率。利用DPS分析软件进行数据处理,求出毒力回归方程、LD₅₀及95%置信限等。

1.2.2 抗性选育方法 以甘蓝薄翅螟的3龄幼虫为试虫,根据毒死蜱对上一代的毒力,选定导致种群30%~60%死亡的剂量,用点滴法处理供选试虫,并以存活下来的个体作为下一代的亲本,逐代用毒死蜱进行汰选,选育出甘蓝薄翅螟对毒死蜱的抗性种群。测定毒死蜱对每个汰选世代的LD₅₀,并以毒死蜱对甘蓝薄翅螟相对敏感品系的LD₅₀为基准,计算出每个汰选世代的相对抗性倍数。

相对抗性倍数 = 筛选品系的LD₅₀/相对敏感品系的LD₅₀。

1.2.3 现实遗传力的估算和抗性发展速率的预测

根据Tabashnik的阈状分析法^[4](threshold trait analysis),计算甘蓝薄翅螟对毒死蜱的抗性现实遗传力(h^2): $h^2 = R/S$, 式中: R 为选择反应,即筛选亲本

的子代与筛选前整个亲代间的平均表现型差异,计算公式为 $R = (\text{筛选后第 } n \text{ 代 LD}_{50} \text{ 的对数值} - \text{筛选前亲代 LD}_{50} \text{ 的对数值})/n$; S 为选择差异值,是指用于筛选亲本与整个亲本代之间的平均表现型差异,计算公式为 $S = i\delta_p$, i 是选择强度,计算公式为 $i = 1.583 - 0.0193336P + 0.0000428P^2 + 3.65194/P$ ($10 < P < 80$, $P = 100 - \text{平均校正死亡率}$), δ_p 是表现型标准差,是筛选前亲本毒力回归线的斜率(起始斜率)与 n 代筛选后子代毒力回归线斜率(最终斜率)平均数的倒数。

选取毒死蜱对甘蓝薄翅螟校正死亡率为50%、60%、70%、80%和90%的情况,对抗性增加10倍所需的汰选代数进行预测。

1.2.4 羧酸酯酶活性测定 参照Van Asperen的方法^[5],略加改进。将试虫称质量后用预冷的0.04 mol·L⁻¹ pH7.0磷酸缓冲液清洗干净,按4头·mL⁻¹置于预冷的磷酸缓冲液中匀浆,匀浆液在5000 r/min离心10 min,取上清液作酶源。反应体积7 mL,其中含0.1 mL酶液、0.9 mL磷酸缓冲液、5 mL 1×10^{-4} mmol/L α -乙酸萘酯。在30℃下震荡30 min后取出,加入1 mL显色剂,室温静置30 min,测 $D_{600 \text{ nm}}$ 。利用双倒数作图法,求出 K_m 和 $V_{\max}$ 。

1.2.5 谷胱甘肽转移酶活性测定 参照Clark等的方法^[6],略加改进。将试虫称质量后用预冷的0.1 mol·L⁻¹ pH6.5磷酸缓冲液清洗,按4头·mL⁻¹置于预冷的磷酸缓冲液中匀浆,匀浆液在5000 r/min离心10 min,取上清液作酶源。反应体积4 mL,其中含0.8 mL酶液、1.6 mL磷酸缓冲液、0.8 mL 5×10^{-3} mol·L⁻¹的还原型谷胱甘肽和0.8 mL 5×10^{-3} mol·L⁻¹的1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)。在37℃下水浴反应10 min取出,加入1 mL预冷的缓冲液,测定340 nm处的光密度值,根据CDNB的摩尔吸光系数计算酶活力。

1.2.6 多功能氧化酶活性测定 采用Hung等的方法^[7]测定。

1.2.7 酶源蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝染色法测定^[8]。

2 结果与分析

2.1 甘蓝薄翅螟对毒死蜱的抗性选育

选育前(F_0)甘蓝薄翅螟3龄幼虫对毒死蜱的LD₅₀为0.048 22 μ g·头⁻¹。选育的药剂剂量根据每代三龄幼虫的LD₅₀来确定,共选育10代。在选育过程中,甘蓝薄翅螟对毒死蜱的抗性直线上升,筛选10代后其抗性水平上升了10.13倍(表1)。

表1 甘蓝薄翅蛾对毒死蜱的抗性品系筛选

Tab.1 Resistance selection of *Crociodolomia pavonana* by chlorpyrifos

筛选代数 generations of selection	药剂点滴量 dose/ ($\mu\text{g} \cdot \text{头}^{-1}$)	24 h 校正死亡率 correction mortality/%	毒力回归方程 LD-p line	LD ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{头}^{-1}$)	95% 置信限 95% CL	相关 系数(r)	相对抗性倍数 resistance ratio
F ₀			$y = 4.21x + 10.54$	0.048	0.043 50 ~ 0.055 79	0.96	1.00
F ₁	0.048 0	48.97	$y = 4.13x + 10.41$	0.049	0.040 26 ~ 0.057 04	0.98	1.02
F ₂	0.053 6	48.72	$y = 5.20x + 11.54$	0.055	0.051 04 ~ 0.061 32	0.98	1.15
F ₃	0.056 6	41.01	$y = 5.04x + 10.85$	0.069	0.063 37 ~ 0.075 57	0.99	1.43
F ₄	0.052 0	33.33	$y = 3.73x + 9.14$	0.078	0.069 29 ~ 0.085 97	0.97	1.61
F ₅	0.060 9	37.30	$y = 2.96x + 8.22$	0.082	0.071 50 ~ 0.095 28	0.97	1.70
F ₆	0.087 0	49.20	$y = 3.72x + 8.89$	0.090	0.080 50 ~ 0.103 10	0.99	1.88
F ₇	0.130 5	45.33	$y = 3.33x + 7.90$	0.134	0.118 10 ~ 0.155 60	0.97	2.79
F ₈	0.174 0	51.12	$y = 4.73x + 8.66$	0.168	0.154 10 ~ 0.184 80	0.99	3.50
F ₉	0.261 0	49.74	$y = 7.15x + 9.47$	0.236	0.219 60 ~ 0.251 70	0.99	4.93
F ₁₀	0.522 0	56.37	$y = 2.86x + 5.89$	0.486	0.483 00 ~ 0.525 00	0.98	10.13

2.2 甘蓝薄翅蛾对毒死蜱的抗性现实遗传力及抗性发展速率预估

根据测定结果,平均选择反应值(R)为0.100 6,平均选择差异值(S)为0.207 4,推算出甘蓝薄翅蛾对毒死蜱的抗性现实遗传力 $h^2 = 0.485$ 。假设汰选的平均校正死亡率分别为50%、60%、70%、80%、90%,筛选前后的毒力回归线的斜率平均值为4.3时,可预测毒死蜱诱导甘蓝薄翅蛾使其种群抗性上升10倍所需代数。在田间甘蓝薄翅蛾不存在寄主之间的虫源转移,并且每代甘蓝薄翅蛾都用毒死蜱防治一次,当田间防效为50%、60%、70%、80%、90%,可估算出抗性增长10倍时,需经过11.13、9.15、7.62、6.35、5.03代。

2.3 甘蓝薄翅蛾的解毒酶活性研究

甘蓝薄翅蛾羧酸酯酶(CarbE)比活力及米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max}),谷胱甘肽转移酶(GSTs)和多功能氧化酶(MFO)的比活力测定结果分别见表2~4。

不同汰选代幼虫的CarbE对 α -萘酚的平均比活力差异显著。F₀的比活力最低,为0.178 mmol · L⁻¹ · min⁻¹ · mg⁻¹,F₁₀的比活力最高,为0.875 mmol · L⁻¹ · min⁻¹ · mg⁻¹。汰选后的F₁₀、F₅的CarbE比活力与F₀的CarbE比活力呈显著差异,F₁₀、F₅代CarbE的 K_m 和 V_{max} 与F₀代CarbE的 K_m 和 V_{max} 差异显著,表明甘蓝薄翅蛾对毒死蜱产生抗性后,其体内CarbE的反应速度提高,与底物的亲和力增强。

表2 羧酸酯酶比活力、米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})的比较¹⁾Tab.2 Comparison of the activities, the V_{max} and K_m of CarbE

代别 generations	羧酸酯酶比活力 the activities of CarbE /(mmol · L ⁻¹ · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	比率 ratio	K_m /(mmol · L ⁻¹)	V_{max} / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
F ₀	0.178 ± 0.010c	1.00	0.149	30.69
F ₅	0.532 ± 0.025b	2.99	0.200	56.34
F ₁₀	0.875 ± 0.003a	4.91	0.263	78.26

1) 同列数字标有相同字母者表示在方差分析中(DMRT法)于0.05水平上无显著差异

表3 谷胱甘肽转移酶比活力的比较

Tab.3 Comparison of the activities of GSTs

代别 generations	谷胱甘肽转移酶比活力 specific activity of GSTs/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	比率 ratio
F ₀	6.35 ± 0.21c	1.00
F ₅	16.87 ± 0.35b	2.66
F ₁₀	25.36 ± 0.13a	3.99

1) 同列数字标有相同字母者表示在方差分析中(DMRT法)于0.05水平上无显著差异

表4 多功能氧化酶比活力的比较

Tab.4 Comparison of the activities of MFO

代别 generations	多功能氧化酶比活力 specific activity of MFO/ (pmol · L ⁻¹ · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	比率 ratio
F ₀	5.23 ± 1.43c	1.00
F ₅	24.53 ± 0.47b	2.66
F ₁₀	40.13 ± 0.37a	3.99

1) 同列数字标有相同字母者表示在方差分析中(DMRT法)于0.05水平上无显著差异

汰选的 F_{10} 、 F_5 其幼虫的 GSTs 活性与 F_0 的 GSTs 活性相比差异显著,分别为 F_0 的 GSTs 的 3.99 倍和 2.66 倍。说明 GSTs 活性增强可能是甘蓝薄翅螟对毒死蜱产生抗药性的主要原因之一。

汰选的 F_{10} 、 F_5 其幼虫的 MFO 平均比活力与相对敏感种群的 MFO 平均比活力相比差异显著,汰选代的 MFO 平均比活力逐代上升。表明甘蓝薄翅螟对毒死蜱抗药性的形成与 MFO 活性增强有密切关系。

3 讨论

室内害虫抗性汰选可为害虫抗性风险的预测提供依据。甘蓝薄翅螟 3 龄幼虫对毒死蜱抗性的汰选结果表明,汰选 10 代后,其抗性水平上升了 10.13 倍。根据该虫对毒死蜱的抗性现实遗传力,可估算出,当在田间用毒死蜱防治甘蓝薄翅螟,防效为 50%、60%、70%、80% 和 90% 时,甘蓝薄翅螟对毒死蜱的抗性增长 10 倍,分别需用毒死蜱持续防治该虫 11.13、9.15、7.62、6.35 和 5.03 代。Tabashnik 阙值分析法的主要缺点是抗性遗传力的估算来自于室内种群,与田间种群的遗传力有一定的差异,但是通过室内汰选计算的抗性现实遗传力所预测的抗性的发展速率与田间实际抗性发展速率具有一定的可比性。因此,用室内抗性汰选的方法进行害虫的抗药性风险评价仍具有一定的参考意义。

害虫对农药解毒代谢能力的提高是害虫重要的抗性机制。本文研究证明了甘蓝薄翅螟对毒死蜱抗药性的形成和发展与其体内的羧酸酯酶 (CarbE)、谷胱甘肽转移酶 (GSTs) 和多功能氧化酶 (MFO) 的活力增强有关。

据报道,CarbE 是昆虫体内重要的水解酶系之一,其在对有机磷杀虫剂的代谢中起着重要的作用;GSTs 是昆虫体内重要的解毒酶系之一,该酶在一些昆虫对有机磷、氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性的过程中所起的作用已经得到证实;MFO 是昆虫体内一类重要的氧化代谢酶系,在昆虫的生长发育、昆虫对寄主植物的适应性及对杀虫剂的抗药性中起着重要作用^[9-10]。本文通过测定用毒死蜱诱导后不同代数幼虫的羧酸酯酶比活力、米氏常数和最大反应速率,与诱导前种群幼虫的羧酸酯酶比活力、米氏常数和最大反应速率进行比较,结果表明,不同代数羧酸酯酶比活力之间存在显著差异,其羧酸酯酶比活力、米氏常数的变化与各代的 LD_{50} 呈正相关,这说明诱导后的甘蓝薄翅螟体内的羧酸酯酶的质和量都发生了变化,甘蓝薄翅螟对毒死蜱抗性的提高与羧酸酯酶

活力的增强有关;对诱导后各代谷胱甘肽转移酶比活力的测定结果表明,诱导后各代谷胱甘肽转移酶比活力与诱导前种群差异显著,其比活力与各代 LD_{50} 呈正相关,因此甘蓝薄翅螟抗性的上升与谷胱甘肽转移酶有关;对多功能氧化酶比活力测定结果表明,诱导后的多功能氧化酶比活力逐代上升,与各代毒力大小呈正相关,说明甘蓝薄翅螟抗性的上升与多功能氧化酶比活力有关。明确甘蓝薄翅螟的抗药性机制,对今后制定该虫的抗性治理策略具有重要意义。

参考文献:

- [1] SAUCKE H, DORI F, SCHMUTTERER H. Biological and integrated control of *Plutella xylostella* (Lep., Yponomeutidae) and *Crociodolomia pavonana* (Lep., Pyralidae) in brassica crops in Papua New Guinea [J]. Biocontrol Science and Technology, 2000(10):595-606.
- [2] 高华, 曾东强, 韦家书, 等. 甘蓝薄翅螟的生物学特性 [J]. 昆虫知识, 2007, 44(5):635-637.
- [3] FAO. Method for the diamond back moth (*Plutella xylostella* L.) [J]. FAO Plant Prote Bull, 1979, 27(2):44-46.
- [4] TABASHNIK B E. Resistance risk assessment realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae), and colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. J Econ Entomol, 1992, 85(5):1551-1559.
- [5] VAN ASPEREN K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method [J]. Insect Physiol, 1962, 8(1):401-416.
- [6] CLARK A G, DICKG L, SMITH J N, et al. Kinetic studies on a glutathion-S-transferase from the larvae of *Costelytra zealandica* [J]. J Biochem, 1984(217):51-58.
- [7] HUNG C F, SUN C N. Microsomal monooxygenases in diamondback moth larvae resistant to fenvalerate and piperonyl butoxide [J]. Pestic Biochem Physiol, 1989(33):168-175.
- [8] BRADFORD M M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding [J]. Anal Biochem, 1976(72):248-254.
- [9] 唐振华. 我国昆虫抗药性研究的现状及展望 [J]. 昆虫知识, 2000, 37(2):97-103.
- [10] 吕敏, 刘惠霞, 吴文君. 谷胱甘肽 S-转移酶与昆虫抗药性的关系 [J]. 昆虫知识, 2003, 40(3):204-208.

【责任编辑 周志红】