

白背飞虱不同地区种群的抗药性研究*

姚洪渭 蒋彩英 叶恭银 程家安** (浙江大学应用昆虫学研究所, 杭州 310029)

【摘要】 测定了白背飞虱浙江和广西种群(迁入虫源)、云南和海南种群(当地虫源)的抗药性程度,以及抗性相关酶系即非特异性酯酶、羧酸酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶和乙酰胆碱酯酶等比活力。云南和海南种群对各药剂抗性水平明显较高,但个体异质性则低于浙江和广西种群;4种酶平均比活力以浙江和广西种群明显为高,其中浙江种群个体间酶活频率分布较宽而广西种群则相反。最后,就白背飞虱不同种群抗药性水平及其相关酶活性的地区差异性与该飞虱长距离迁飞的关系进行了讨论。

关键词 白背飞虱 抗药性 酶活性

文章编号 1001-9332(2002)01-0101-05 **中图分类号** S481.42 **文献标识码** A

Insecticide resistance of different populations of white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Horváth) (Homoptera: Delphacidae). YAO Hongwei, JIANG Caiying, YE Gongyin and CHENG Jiaan (Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029). - *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2002, 13(1): 101~105.

Resistance to some insecticides used commonly in different populations of the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* collected from Zhejiang, Guangxi, Yunnan and Hainan Province in China was measured. The specific activities of some resistance-associated enzymes, i. e. esterase, carboxylesterase, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase from these populations were also measured. The resistant levels to malathion, methamidophos, isoprocarb and buprofezin were markedly higher in Yunnan and Hainan populations than in other populations, but considerably more heterogeneity in response to insecticides was found in Zhejiang and Guangxi populations. The specific activities of the enzymes were obviously higher in Zhejiang and Guangxi populations than in Yunnan and Hainan populations, and the distribution range of the enzyme activity was the widest in Zhejiang population, and the narrowest in Guangxi population. Finally, The relationship between the long-distance migration and the territorial difference in insecticide resistant level and activities of the enzymes in the populations of this planthopper was discussed.

Key words *Sogatella furcifera*, Insecticide resistance, Enzyme activity.

1 引言

白背飞虱(*Sogatella furcifera* (Horváth))属迁飞性水稻害虫,常暴发成灾。该飞虱虽能在我国南方少数地区终年繁殖,但我国大陆虫源主要来自中南半岛湄公河三角洲的冬春稻上,每年随西南季风首降两广地区,后随早稻收割及成熟而逐渐由南向北迁飞^[17]。鉴于白背飞虱发生、为害特点,目前在水稻生产应急防治措施中,使用化学杀虫剂来控制其为害仍占据重要地位,从而导致该飞虱已对多种化学杀虫剂产生抗性^[2,5,12,16],且其抗性机制与褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)、灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)和黑尾叶蝉(*Nephotetix cincticeps*)等相似,多与体内非特异性酯酶、羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶等活性改变有关^[3,4,13,15]。由于白背飞虱抗性水平变化明显受其长距离迁飞影响^[9],如 Fukuda 等^[6]曾报道日本褐飞虱田间种群对 BHC 抗性水平的周期性波动与每年春季对杀虫剂敏感飞虱种群的迁入密切相关。因此,监测、分析不同地区白背飞虱种群药剂敏感性及其体内相

关酶系活性的变异,对于深入阐明其迁飞规律、准确测报其发生并指导合理防治具有重要意义。本文对不同地区白背飞虱种群药剂敏感性及其体内相关酶系活性进行测定与比较,结果如下。

2 材料与方法

2.1 供试材料

2.1.1 供试虫源 分别以 1997 年采自海南陵水、云南景洪当地越冬成虫和广西南宁、浙江富阳迁入代成虫为供试虫源,并在浙江大学田间养虫室内用 TN1 稻苗饲养 1 代,以供试验用。

2.1.2 供试药剂 94.5% 马拉硫磷(浙江宁波农药厂)、99.5% 甲胺磷、98% 叶蝉散和 95.1% 扑虱灵(浙江省农业厅药检所提供)。

2.2 研究方法

2.2.1 毒力测定 采用 FAO 推荐的农业害虫标准毒力测定点滴法。选用羽化后 2~3d 的个体大小基本一致的雌成虫供以测定,扑虱灵毒力测定中采用 5 龄若虫。各药剂以丙酮

* 国家自然科学基金重点资助项目(39630200)。

** 通讯联系人。

2000-03-16 收稿,2000-07-17 接受。

为溶剂配制系列浓度,以丙酮液为对照,每处理点滴 10 头试虫,重复 2~3 次。先用 CO₂ 麻醉试虫 10s,后迅速用微量点滴器(中国科学院上海昆虫研究所制)将药液滴于试虫前胸背板上,每虫 0.25 μ l;然后将处理的试虫移入放有 TN1 幼苗的大玻管中饲养,24h 后考察死亡率,求出各药剂毒力回归方程和 LD₅₀值,并比较各种群间药剂敏感性差异。

2.2.2 酯酶同工酶电泳分析 分别取各种群单头成虫,加 25 μ l 0.067mol·L⁻¹ PBS 缓冲液(pH 7.2)匀浆。尔后以 10000rpm 速度离心 10min,取上清液,加 5 μ l 40%蔗糖液和 2 μ l 0.05%溴酚蓝,混匀后供电泳加样。电泳时,参照张龙翔等^[18]以垂直夹心式电泳槽进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。分离胶浓度为 10.5%,浓缩胶浓度 2.5%,凝胶厚 1.5mm,加样量 25 μ l。稳压 200V,电泳 3~4h。电泳结束后,取出胶板浸泡于酯酶染色液[37.5mg-醋酸萘酯和 37.5mg-醋酸萘酯溶于 6ml 丙酮,再加入 144ml 0.067mol·L⁻¹ PBS(pH 7.2)和 155mg 坚固盐 RR,搅拌至完全溶解]中,30 下显色 20min。待酶带显出后,置脱色液(500ml 甲醇+500ml 水+90ml 冰醋酸)中脱色数次。最后记录酶谱带及其迁移率。

2.2.3 体内抗药性相关酶系活性测定 1) 酶源制备:分别取各种群单头成虫于 100 μ l 0.067mol·L⁻¹ (pH 7.2) PBS 缓冲液中匀浆,10000rpm 离心 10min,取上清液为粗酶源液;2) 非特异性酯酶与羧酸酯酶活性测定:参照 Hama 等^[8]比色测定法,反应体系 4ml 包括 0.067mol·L⁻¹ pH 7.2 PBS 缓冲液 3.99ml、3×10⁻⁴ mol·L⁻¹ -醋酸萘酯或 -醋酸萘酯 1ml 和酶液 10 μ l,30 下反应 10min。尔后加 1ml 显色剂(1%坚固蓝 B 盐和 5%SDS 以 2:5 混合)终止反应,测定吸光值,其中 -醋酸萘酯为底物时测定波长为 600nm, -醋酸萘酯时为 550nm。测定羧酸酯酶活力时,在 PBS 缓冲液中加入有毒扁豆碱(终浓度为 10⁻⁵ mol·L⁻¹)。其余步骤同非特异性酯酶;3) 乙酰胆碱酯酶活性测定:参照高希武^[7],采用 Ellman 胆碱酯

酶活力测定改进法。20 μ l 酶液加入 0.9ml 0.1mol·L⁻¹ pH 7.5 PBS 缓冲液中,再加 100 μ l 5×10⁻⁴ mol·L⁻¹ 碘化硫代乙酰胆碱底物,30 下反应 25min,后以 1ml DTNB-磷酸盐乙醇显色剂(12.4mg DTNB、120ml 96%乙醇和 80ml 水以 0.1mol·L⁻¹ pH 7.5 PBS 缓冲液定容至 250ml)终止反应,于 412nm 处测定吸光值;4) 谷胱甘肽转移酶活性测定:参照 Oppenoorth 等^[14],20 μ l 酶液加入 1.9ml 0.1mol·L⁻¹ pH 7.5 PBS 缓冲液中,再加 1ml 0.01mol·L⁻¹ 谷胱甘肽和 100 μ l 0.1mol·L⁻¹ CDNB。在 340nm 处测定吸光值。酶活测定在 3min 内呈线性,反应温度为 25^o;5) 可溶性蛋白含量测定:参照 Bradford^[11],用考马斯亮蓝 G₂₅₀测定各酶液中可溶性蛋白含量。以牛血清蛋白制作标准曲线。

3 结果与分析

3.1 不同种群药剂敏感性比较

由表 1 可知,与福田秀夫等^[6]结果相比,白背飞虱各种群对马拉硫磷和叶蝉散均已产生不同程度抗性,其抗性指数分别为 16.2~137.2 倍和 10.3~15.6 倍。不同种群间相比,对马拉硫磷的抗性以云南和海南种群明显为高,且两种群的毒力曲线斜率较大,说明两群体中个体抗药性之间差异较小。就甲胺磷而言,各种群间 LD₅₀值差异为 2.5%~17.02%,其中以云南种群 LD₅₀值最高,毒力曲线斜率最低,说明该种群对甲胺磷耐性较强,且不同个体间差异较大,即群体异质性较高。各种群对叶蝉散和扑虱灵的敏感性差异分别为 8.2%~34.2%和 5.4%~95.3%,其中 LD₅₀值均以浙江和广西种群为低,斜率以浙江种群最高,广西种群最低。这表明白背飞虱不同种群对不同

表 1 白背飞虱不同种群的药剂敏感性

Table 1 Insecticide susceptibility in different populations of the white-backed planthopper

种群 Population	马拉硫磷 Malathion			甲胺磷 Methamidophos			叶蝉散 Isoprocarb			扑虱灵 Buprofezin		
	LD ₅₀ (μ g/)	b*	RI**	LD ₅₀ (μ g/)	b	RI	LD ₅₀ (μ g/)	b	RI	LD ₅₀ (μ g/)	b	RI
浙江 Zhejiang	0.1010	2.5	40.4	0.0120	4.0	-	0.0134	3.8	11.2	0.0168	1.8	-
广西 Guangxi	0.0405	1.4	16.2	0.0128	5.4	-	0.0123	2.8	10.3	0.0159	0.3	-
云南 Yunnan	0.2135	2.8	85.4	0.0141	2.3	-	0.0187	3.1	15.6	0.0285	1.1	-
海南 Hainan	0.3431	2.5	137.2	0.0117	3.6	-	0.0177	3.5	14.8	0.3398	0.5	-

* b:剂量-死亡率回归直线斜率 The slope of dosage-mortality regression line. **RI(抗性指数):各种群 LD₅₀值与 Fukuda 等^[6]LD₅₀值之比 The ratio of LD₅₀ values in different populations compared with the data in Fukuda *et al*^[6].

药剂的敏感度和群体反应均度上存在明显差异。

3.2 不同种群酯酶同工酶谱比较

由图 1 可见,各种群成虫酯酶同工酶谱基本相同,均可见 6 条谱带,其迁移率分别为 0.012、0.05、0.08、0.11、0.14 和 0.18。雌成虫各谱带颜色以海南、云南种群为深,即酯酶同工酶活性相对较高;雄成虫则恰相反,多以浙江种群为高。

3.3 不同种群体内抗药性相关酶系活性及其分布频率比较

3.3.1 非特异性酯酶和羧酸酯酶 由(图 2、3)可见,白背飞虱不同种群非特异性酯酶平均活力多以浙江和广西种群明显为高,分别约为云南和海南种群的 2 倍。就单头个体非特异性酯酶比活力的分布频率来看,各种群酶活性均集中在 1~5 μ mol·min⁻¹·mg⁻¹ 范围内,其中以浙江和广西种群酶活分布幅度较宽,并在高酶活区段中有较多分布。以不同底物(-醋酸萘酯和 -醋酸萘酯)测定的结果均表现出相同趋势。不同种群羧酸酯酶平均酶活及其频率分布

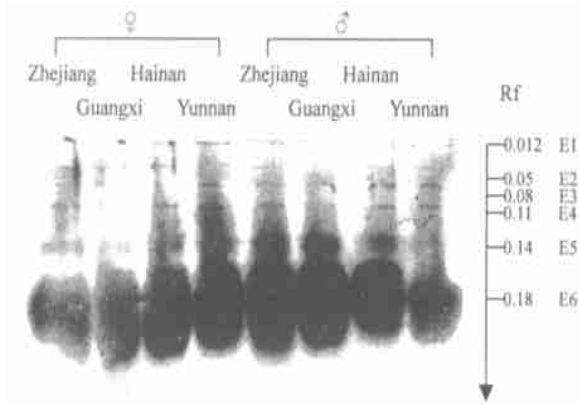


图1 白背飞虱不同种群酯酶同工酶电泳图谱
 Fig. 1 Diagram of esterase isozymes on polyacrylamide gel in the different populations of white-backed planthopper.

与非特异性酯酶相似。

3.3.2 谷胱甘肽-S-转移酶和乙酰胆碱酯酶 由图4、5可见,不同种群谷胱甘肽-S-转移酶平均酶活以浙江和云南种群为高,其中浙江种群平均酶活力分

别为广西和海南种群的1.4和1.6倍,云南种群平均酶活分别为1.7和1.9倍。各种群单头酶比活力多分布于0~5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 范围内,其中以浙江和云南种群分布幅度较宽,并在高酶活区段中有一定分布。海南种群乙酰胆碱酯酶平均酶活及单头酶活分布幅度均明显低于浙江、广西和云南种群,而后3种群在平均酶活及其频率分布上无明显差异。

4 讨论

白背飞虱不同种群药剂敏感性及其相关酶系活性存在一定差异性,且似与该飞虱的长距离迁飞有关。在云南及海南地区能常年繁殖的当地种群对4种药剂的耐受性较高,而浙江和广西迁入种群的抗性水平较低。云南和海南种群对各药剂反应的个体异质性较为相似;广西种群除对甲胺磷敏感性个体间差异较小外,对其余3种药剂的个体异质性均较大;浙江种群对各药剂的反应较均匀,即群体异质性

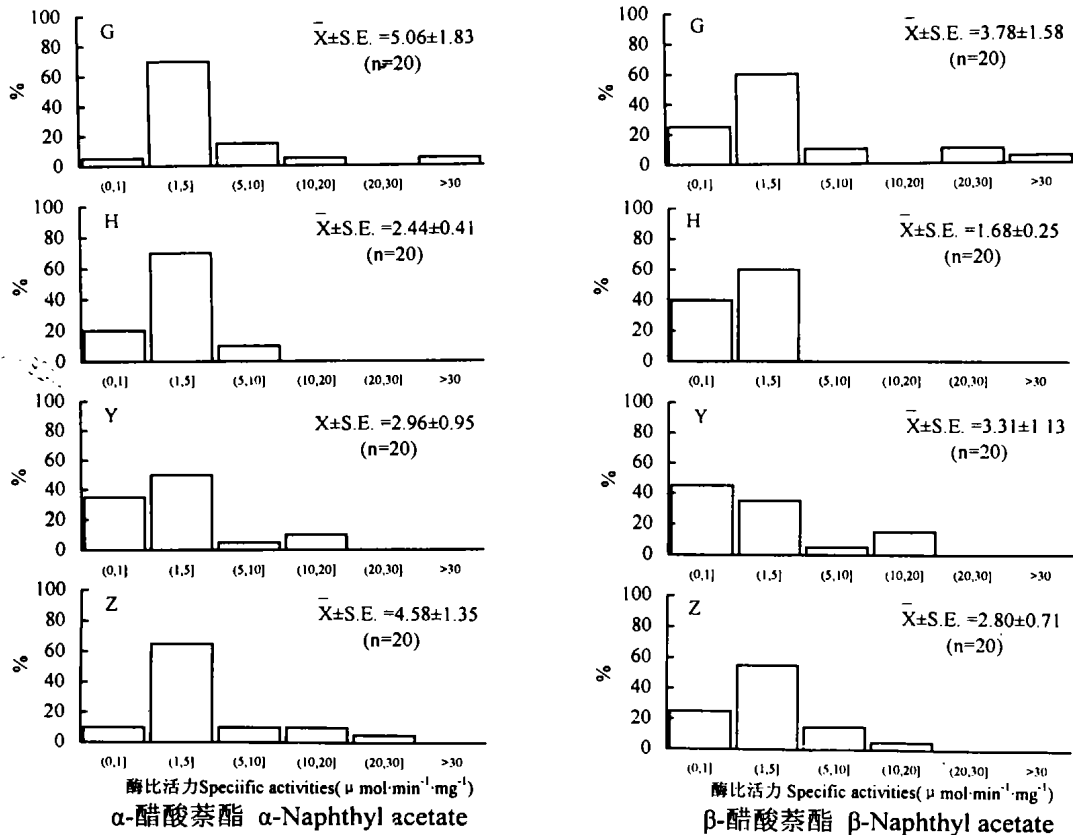


图2 白背飞虱不同种群非特异性酯酶活力的频率分布
 Fig. 2 Distribution of esterase activity in different populations of white-backed planthopper.
 G. 广西种群 Guangxi population; H. 海南种群 Hainan population; Y. 云南种群 Yunnan population; Z. 浙江种群 Zhejiang population. 下同 The same below.

较小。白背飞虱各种群酯酶同工酶的电泳结果与其抗性测定结果一致。但对各种群体内抗药性相关酶系活力测定的结果却表现相反趋势,即浙江和广西

种群各酶系平均比活力明显高于云南和海南种群,这可能与浙江和广西种群体内可溶性蛋白的平均含量(各为 22.15 ± 3.22 和 $25.72 \pm 3.60 \mu\text{g}\cdot\text{头}^{-1}$)显

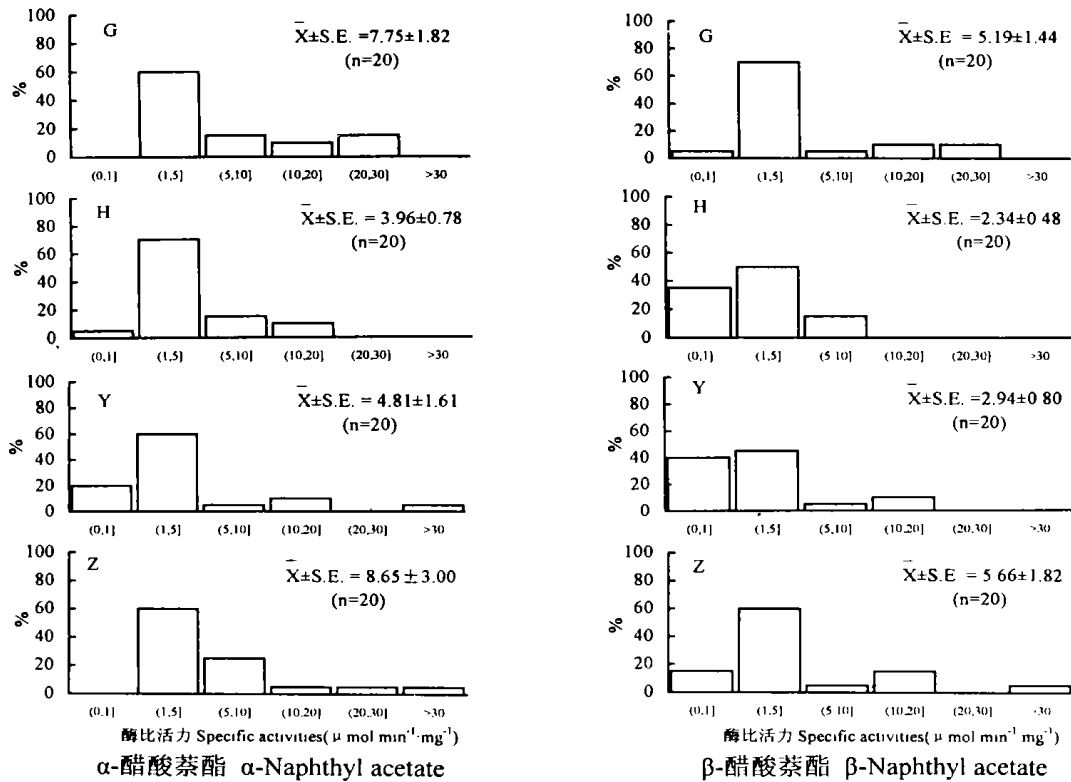


图3 白背飞虱不同种群羧酸酯酶活力的频率分布
Fig.3 Distribution of carboxylesterase activity in different populations of white-backed planthopper.

著低于云南和海南种群(各为 35.60 ± 5.93 和 $30.28 \pm 3.74 \mu\text{g} \cdot \text{头}^{-1}$)有关.就不同种群相关酶活性分布频率来看,亦多表现为云南和海南当地种群酶活频率分布幅度较窄,浙江和广西迁入种群分布较宽,说明迁入种群个体间酶活差异较当地种群的大.综合本文所有各种群参数指标经标准化转换后以类平均法进行系统聚类,证明同为迁入虫源的浙江和广西种群具有较高同源性,而与海南及云南当地种群存在一定差异(图6).

白背飞虱不同种群抗药性虽存在一定地区差异,但并不能由此确定该飞虱存在地理型,况且诸如白背飞虱这类具远距离迁飞特性的昆虫,在大范围地理区域中一般不存在基因流动的障碍.虫源地飞虱抗性程度以及长距离迁飞过程可能最终造成不同种群抗药性的地区差异.长距离迁飞是一定数量抗药性水平不同的飞虱种群由不同虫源地同时迁往别处的一个连续时空动态过程^[11],不同基因型种群在高空混合可导致迁入种群抗药性及其相关酶活性在个体间表现出一定的异质性,如本文广西种群可能即是如此.此外,在长距离迁飞过程中必然伴随着虫体内能量的极大消耗,从而在体内发生一系列生理生化变化,致使其生存适合度下降^[10].本文浙江种群药剂敏感性相对较高而群体异质性相对较

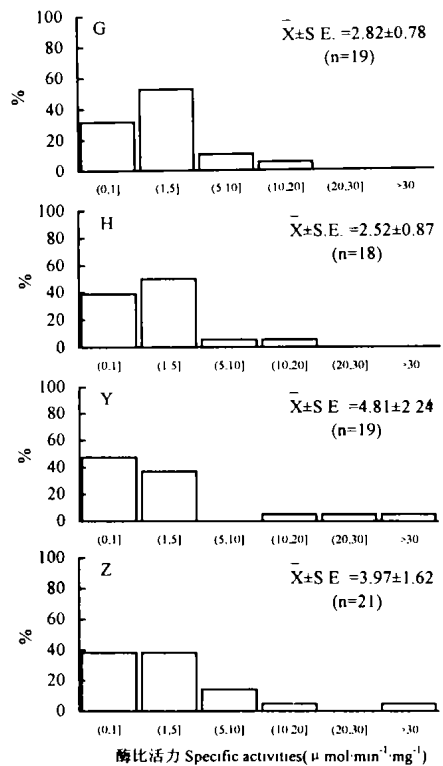


图4 白背飞虱不同种群谷胱甘肽-S-转移酶活力的频率分布
Fig.4 Distribution of glutathione S-transferase activity in different populations of white-backed planthopper.

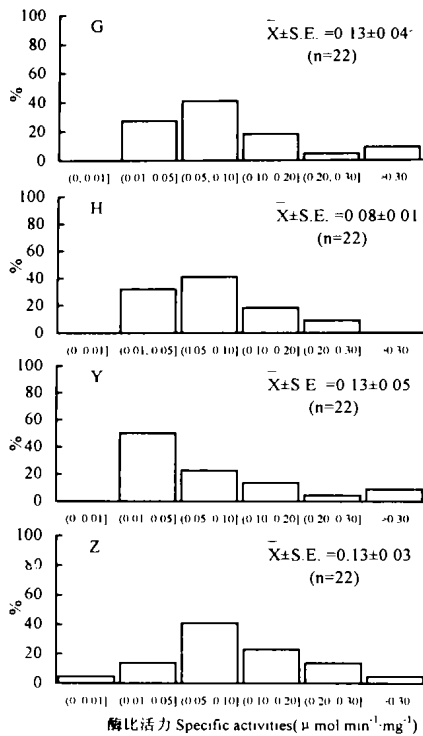


图5 白背飞虱不同种群乙酰胆碱酯酶活性的频率分布
Fig.5 Distribution of acetylcholinesterase activity in different populations of white-backed planthopper.

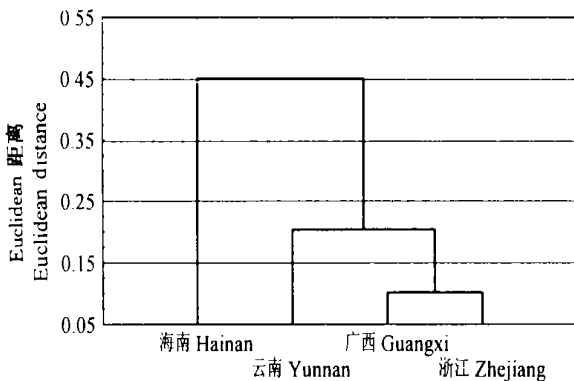


图6 白背飞虱不同种群抗药性有关参数的聚类分析
Fig.6 Clustering analysis of the parameters related to insecticide resistance in different populations of white-backed planthopper.

低,可能是由于在迁飞中存在适合度的选择过程,即敏感个体适合度较高,经长距离飞行到达迁入地后仍能生存繁殖;而大部分抗性个体则被淘汰。

弄清害虫抗药性与迁飞之间的相互动态关系对于探明害虫成灾机制以及进行灾变预警与调控具有十分重要意义,而目前就这方面研究尚少,有待于深入开展。

参考文献

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**:248 ~ 254
- Cao C-R (曹昌日), Shou Z-B (首章北), Miao M-H (廖茂华).

1987. Monitoring of insecticide resistance in two species of rice planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål and *Sogatella furcifera* (Horvath). *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), **4** (supp.): 135 ~ 138 (in Chinese)
- 3 Chen WL and Sun CN. 1994. Purification and characterization of carboxylases of a rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål. *Insect Biochem Mol Biol*, **24**:347 ~ 355
- 4 Endo S, Masuda T, Kazano H. 1988. Development and mechanism of insecticide resistance in rice brown planthoppers selected with malathion and MTMC. *J Pestic Sci*, **13**(2): 239 ~ 245
- 5 Endo S, Nagata T, Kawabe S, et al. 1988. Changes of insecticide susceptibility of the white backed planthopper *Sogatella furcifera* Horváth (Homoptera: Delphacidae) and the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Appl Ent Zool*, **23**(4): 417 ~ 421
- 6 Fukuda H and Nagata T. 1969. Selective toxicity of several insecticides on three planthoppers. *Jap J Appl Ent Zool*, **13**:142 ~ 149 (in Japanese)
- 7 Cao X-W (高希武). 1987. An introduction to Gorun et al. modified Ellman procedure for assay of cholinesterases. *Ent Knowl* (昆虫知识), **24**(4): 245 ~ 246 (in Chinese)
- 8 Hama H and Hosoda A. 1983. High esterase activity and low acetylcholinesterase sensitivity involved in organophosphorus and carbamate resistance of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Appl Ent Zool*, **18**(4): 475 ~ 485
- 9 Heinrichs EA. 1994. Impact of insecticides on the resistance and resurgence of rice planthopper. In: Denno RF and Perfect TJ eds. *Planthoppers: their ecology and management*. New York: Chapman & Hall. 571 ~ 598
- 10 Hua H-X (华红霞), Deng W-X (邓望喜). 1997. A comparative study on biological characteristics of different geographic populations of brown planthoppers *Nilaparvata lugens* (Stål). *Acta Ent Sin* (昆虫学报), **40** (supp.): 147 ~ 152 (in Chinese)
- 11 Kilin D, Nagata T and Masuda T. 1981. Development of carbamate resistance in the brown planthopper. *Appl Ent Zool*, **16**:1 ~ 6
- 12 Mao L-X (毛立新), Liang T-X (梁天锡). 1992. Monitoring in susceptibility of white backed planthopper and brown planthopper to thirteen insecticides. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), **6**(2): 70 ~ 76 (in Chinese)
- 13 Motogoyama LR, Kao P, Lin T, et al. 1984. Dual role of esterases in insecticide resistance in the green rice leafhopper. *Pestic Biochem Physiol*, **21**:139 ~ 147
- 14 Oppenoorth FJ, Van der Pas LJR and Houx NWH. 1979. Glutathione-S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistance strain of housefly and their influence on resistance. *Pestic Biochem Physiol*, **11**:176 ~ 188
- 15 Sakata K and Miyata T. 1994. Biochemical characterization of carboxylesterase in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus* (Fallén). *Pestic Biochem Physiol*, **50**:247 ~ 256
- 16 Wang Y-C (王荫长), Li G-Q (李国清), Tian X-Z (田学志), et al. 1996. Comparison of insecticide resistance and field efficacy in *Sogatella furcifera* and *Nilaparvata lugens*. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), **19**(supp.): 16 ~ 21 (in Chinese)
- 17 Wu GR (巫国瑞), Yu X-P (俞晓平), Tao L-Y (陶林勇). 1997. Long-term forecast on the outbreak of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) and white-backed planthopper (*Sogatella furcifera* Horvath). *Sci Agric Sin* (中国农业科学), **30**(4): 25 ~ 29 (in Chinese)
- 18 Zhang L-X (张龙翔), Zhang T-F (张庭芳), Li L-Y (李令媛). 1997. *Methods and Techniques in Biochemical Experiments* (2nd ed). Beijing: High Education Press. 85 ~ 100 (in Chinese)

作者简介 姚洪渭,男,1973年生,博士,主要从事昆虫抗药性方面的研究. 发表论文 12 篇. Tel: 0571-86971696; E-mail: chu @zju. edu. cn