

褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株解毒酶活性的比较

李娜¹, 陈建明^{2,*}, 张珏锋², 何月平², 陈列忠²

(¹ 杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036; ² 浙江省农业科学院 植物保护与微生物研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 比较测定了褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株 3 种解毒酶活性的变化。结果表明, 褐飞虱共生菌不同抗感吡虫啉菌株 3 种解毒酶活性差异显著 ($P < 0.05$), 其中抗吡虫啉菌株的羧酸酯酶、多功能氧化酶活性显著高于敏感菌株, 而谷胱甘肽-S-转移酶活性差异不显著。说明褐飞虱共生菌对吡虫啉抗药性的提高, 与其体内羧酸酯酶、多功能氧化酶的活性增强有关。

关键词: 褐飞虱共生菌; 抗吡虫啉菌株; 敏感菌株; 解毒酶活性; 抗药性

中图分类号: S 482.3*9

文献标识码: A

文章编号: 1004-1524(2010)05-0653-07

Comparison for activities of detoxifying enzymes in resistant-and susceptible-imidacloprid endosymbiotic strains of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål

LI Na¹, CHEN Jian-ming^{2,*}, ZHANG Jue-feng², HE Yue-ping², CHEN Lie-zhong²

(¹ College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; ² Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: Activities of detoxifying enzymes in resistant-and susceptible-imidacloprid endosymbiotic strains of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* were compared. The results showed that resistant-and susceptible-imidacloprid strains had significant difference in activities of detoxifying enzymes, in which, activities of carboxylesterase, mixed function oxidase in resistant-imidacloprid strains were significantly higher than those in susceptible-imidacloprid strains, while activity of glutathione-S-transferase showed no obvious difference between resistant-and susceptible-imidacloprid strains. It was suggested that resistant increasing of *N. lugens* symbiotes to imidacloprid was related to enhancement of carboxylesterase, mixed function oxidase activities.

Key words: *Nilaparvata lugens* endosymbiotes; resistant-imidacloprid strain; susceptible-imidacloprid strain; activity of detoxifying enzymes; resistance

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 是我国及东南亚国家水稻生产上的一种重要远距离迁飞性害虫, 严重威胁我国水稻的安全生产。目前在生产实际中, 化学农药仍是防治褐飞虱的主要手

段。由于化学杀虫剂的大量频繁使用, 褐飞虱对常规杀虫剂产生抗药性, 导致化学防治失败, 造成褐飞虱大发生, 如 2005 年全国褐飞虱大发生的主要原因之一是褐飞虱对新烟碱类杀虫剂——吡虫啉产生高度抗药性^[1,2]。进一步研究发现, 褐飞虱对吡虫啉产生抗性的机制可能与羧酸酯酶等解毒酶的解毒作用增强、乙酰胆碱受体敏感性下降有关^[3-5]。

褐飞虱体内普遍存在着共生菌, 它是一种类酵母菌 (yeast-like symbiotes, 简称 YLS), 隶属于

收稿日期: 2010-05-13

基金项目: 国家自然科学基金 (30771411); 浙江省自然科学基金 (Y307125)。

作者简介: 李娜 (1984-), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生, 研究方向为生理生态。Tel: 0571-86404063; E-mail: linana_84@sohu.com
* 通讯作者, 陈建明, E-mail: chenjm63@163.com; Tel: 0571-86400486

子囊菌亚门核菌纲的假丝酵母属(*Candida*),通常存在于腹部脂肪体内^[6]。研究表明,共生菌在褐飞虱生长发育和繁殖^[7-10]以及致害性变异^[11]中起着重要作用。我们已利用“卵块离体培养法”成功地培养出褐飞虱类酵母共生菌,并分离鉴定了 2 株共生菌株^[12],发现吡虫啉处理对褐飞虱共生菌生长有一定影响^[13]。

长期频繁施用的杀虫剂是害虫生长发育过程中遭遇到的最重要的外界逆境条件。在“生与死”面前,共生菌在害虫对杀虫剂产生抗药性的过程中是否起到作用呢?最近的研究发现,烟碱、印楝、甲基嘧啶磷、芸香苷等外源化合物能诱导烟草甲(*Lasioderma serricorne*)体内类酵母共生菌(*Symbiotaphrina kochii*)的羧酸酯酶活性,离体状态的共生菌对培养基中的结合态烟碱有一定分解作用^[14-18]。这说明,共生菌与害虫对杀虫剂的适应以及抗药性产生有关。但是,共生菌在褐飞虱杀虫剂抗药性产生中的作用研究尚未见报道。本文通过测定褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株与原始敏感菌株之间的解毒酶活性变化,明确褐飞虱共生菌的抗药性与其解毒酶活性的关系,为进一步揭示共生菌在褐飞虱对吡虫啉抗性发展中的作用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验菌株

敏感菌株:本实验室保存的褐飞虱共生菌离体菌株——解脂假丝酵母(*Candida lipolytica*),该菌株没有接触任何农药。

抗性菌株:上述敏感菌株在含 500 倍浓度吡虫啉的培养基中连续培养 20 代获得的菌株(陈建明等,待发表结果)。

1.1.2 主要药剂和试剂

吡虫啉原药,浓度 99.9%,由南京红太阳集团公司生产。

α -乙酸萘酯、1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)(上海试剂一厂),固兰 RR 盐(Farco 公司),NADPH 还原型辅酶 II(Rocha 公司),考马斯亮蓝 G-250(上海化学试剂公司),还原型 L-谷胱甘肽(GSH)、牛血清白蛋白(BSA)(Sigma 公司),对硝

基苯酚、对硝基苯甲醚、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、蔗糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、丙酮均为分析纯。

1.1.3 液体培养基

用本实验室的改进后 CPDA 培养基。其配制方法:将马铃薯削皮后切成小块,加适量水煮开,待马铃薯煮熟后用纱布过滤取滤汁。将称好的各种成分放入搪瓷量杯中,加足所需水量,搅拌均匀,加热溶化。等完全溶化后,补足水分至所需体积。将配好的培养基稍冷却后装入 250 mL 三角瓶,每瓶 100 mL。包扎好后进行灭菌:121℃ 湿热灭菌 20 min。灭菌后待用。

1.2 方 法

1.2.1 菌株培养

抗吡虫啉菌株和敏感菌株分别接种于 1.1.3 节的液体培养基(培养基事先分别加入内含吡虫啉浓度 250 倍、500 倍、1000 倍、2000 倍等 4 个浓度)中,以不加吡虫啉的液体培养基作为对照。3 次重复。28℃ 黑暗培养,从培养的第 2 天开始取样,定时连续取样 5 d,取出的培养液用于测定蛋白质含量和解毒酶活性。

1.2.2 蛋白质含量测定

蛋白质标准曲线的制作:取 6 支 1.5 mL 离心管,按表 1 顺序加入试剂,静置 2 min 后,在 595 nm 下比色测定。以吸光度值为纵坐标,各标准溶液浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标作图得标准曲线。

表 1 标准曲线的制作——考马斯亮蓝 G-250 染色法(单位:mL)

Table 1 Standard curve prepared by the staining method of coomassie brilliant blue G-250

溶液与水	0	1	2	3	4	5
标准牛血清白蛋白溶液	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
蒸馏水	0.1	0.08	0.06	0.04	0.02	0
考马斯亮蓝溶液	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

蛋白质含量测定:测定方法参见 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 染色法^[19]。取上清液 0.1 mL,加考马斯亮蓝溶液 0.5 mL,静置 2 min 后,在 595 nm 下测 OD 值。从蛋白质标准曲线上查出样品对应的蛋白含量。

1.2.3 解毒酶活性测定

首先提取抗、感吡虫啉菌株的酶液。用浙江

省农业科学院植物保护与微生物研究所植保工程研究室提供的改进后 CPDA 培养基培养抗、感吡虫啉菌株。取共生菌的培养液于 5 000 r/min 下离心 5 min 收集菌体,用 0.1 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.4) 缓冲液洗涤 3 次,转入研钵内,用液氮冻融并研磨 1~2 次,最后用磷酸缓冲液 (pH 7.4) 冲洗研钵。每组最后获得菌体混合液 2 mL,作为酶液。

羧酸酯酶 (CarE) 活性: 参考 Han^[20] 和 Qu 的方法^[21]: 酶标板内加入 75 μL 的 α -乙酸萘酯 (10 mmol/L) 与 75 μL 的固兰 RR 盐 (1 mmol/L) 的混合物,再加入 50 μL 的酶液。用酶标仪在 450 nm 波长下,每隔 9 s 记录一次 OD 值,共记录 31 次。酶促反应温度为 27 $^{\circ}\text{C}$ 。酶活力单位以 $\text{OD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg}\cdot\text{pro})^{-1}$ 表示。

谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs) 活性: 参考 Openoorth 方法^[22]: 酶标板中加入 20 μL 的 CDNB (20 mmol/L) 和 80 μL 的 Tris-HCl 缓冲液,再加入 100 μL 的酶液。340 nm 下测 OD 值,每隔 9 s 记录一次,共记录 31 次。酶促反应温度为 27 $^{\circ}\text{C}$ 。酶活力单位以 $\text{OD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg}\cdot\text{pro})^{-1}$ 表示。

多功能氧化酶活性: 参照 Yu 等方法测定多功能氧化酶 (MFO) 活性^[23]: 以对硝基苯甲醚为底物,在 MFO 作用下生成对硝基苯酚钠,在 405 nm 下用分光光度计比色测定。以对硝基苯酚制作标准曲线。反应体系为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的对硝基苯甲醚 100 μL , 9.6 mmol/L 的 NADPH 10 μL 和酶液 90 μL , 30 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 30 min 后测定。酶液经蛋白质测定,得出蛋白质含量。在 405 nm 下用酶标仪测定 OD 值,用对硝基苯酚的生成量表示酶活力 [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot(\text{mg}\cdot\text{pro})^{-1}\cdot(30\text{ min})^{-1}$]。

1.3 统计分析

数据处理均采用 Excel, DPS 软件^[24] 进行分析统计。

2 结果与分析

2.1 羧酸酯酶 (CarE) 活性

随着吡虫啉浓度增加,对吡虫啉敏感菌株体内羧酸酯酶活性下降,尤其是在 500 倍、250 倍浓度下,酶活性分别下降 13.13% ~ 57.5% 和

24.36% ~ 60.87%。对抗吡虫啉菌株而言,仅 250 倍处理的羧酸酯酶活性有显著下降,其他处理 (500 倍、1 000 倍和 2 000 倍) 浓度与对照酶活性无显著差异;同一吡虫啉浓度下,敏感菌株的羧酸酯酶活性显著低于抗性菌株的酶活性 (表 2)。抗、感吡虫啉菌株体内羧酸酯酶活性随培养时间的变化趋势基本一致,随着培养时间增加,酶活性明显提高,培养 4 d 后,酶活性达到最高值,随培养时间的进一步延长,酶活性明显下降 (图 1),说明褐飞虱共生菌可能通过提高体内羧酸酯酶活性来适应吡虫啉的胁迫。

2.2 谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 的活性

同一种菌株,无论敏感菌株还是抗性菌株,在不同吡虫啉浓度之间,共生菌体内谷胱甘肽-S-转移酶活性差异不显著,但在 250 倍浓度培养 6 d 后,敏感菌株的谷胱甘肽-S-转移酶活性显著高于 2 000 倍及未加药的酶活性。同一吡虫啉浓度下,除 1 000 倍及以上浓度的吡虫啉处理 5~6 d 外,其他培养时间和处理浓度敏感菌株的谷胱甘肽-S-转移酶活性与抗性菌株的酶活性无明显差异 (表 3)。抗、感吡虫啉共生菌体内谷胱甘肽-S-转移酶活性与培养时间的关系基本一致。随着培养时间增加,酶活性明显提高,培养 4 d 后,酶活性达到最高值,以后随时间延长,酶活力缓慢下降,但敏感菌株的酶活性下降趋势比抗性菌株大 (图 1)。说明,褐飞虱共生菌的抗药性提高与其体内谷胱甘肽-S-转移酶活性关系不明显。

2.3 多功能氧化酶 (MFO) 的活性

表 4 显示,同一种菌株,无论敏感菌株还是抗性菌株,不同吡虫啉浓度之间,共生菌体内多功能氧化酶活性差异不显著。同一吡虫啉浓度下,敏感菌株的多功能氧化酶活性均显著或极显著低于抗性菌株,尤其是高浓度下。

图 2 表明,不同抗感吡虫啉共生菌体内多功能氧化酶活性与培养时间的关系基本一致。随着培养时间增加,酶活性明显提高,培养 3~4 d 后,酶活性达到最高值,以后随培养时间延长,除 250 倍浓度下继续增加外,其他浓度下酶活性缓慢下降。说明,褐飞虱共生菌的抗药性提高与其体内多功能氧化酶活性有一定关系。

表 2 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株羧酸酯酶活性的比较

Table 2 Comparison for activity of carboxylesterase between resistant-and susceptible-imidacloprid strains of *Nilaparvata lugens* endosymbiotes

培养 时间/d	菌株	药剂不同倍数处理后菌株的羧酸酯酶活性/[OD·min ⁻¹ ·(mg·pro) ⁻¹]				
		250 ×	500 ×	1 000 ×	2 000 ×	0
2	敏感	0.36 ± 0.04 dD ¹⁾ (bB) ²⁾	0.57 ± 0.04 cC (bB)	0.74 ± 0.04 bB (bA)	0.83 ± 0.05 bAB (aA)	0.92 ± 0.04 aA (aA)
	抗性	0.67 ± 0.05 bB (aA)	0.91 ± 0.07 aA (aA)	0.93 ± 0.05 aA (aA)	0.90 ± 0.06 aA (aA)	0.94 ± 0.05 aA (aA)
3	敏感	0.66 ± 0.18 bB (bA)	0.68 ± 0.08 bB (bB)	1.40 ± 0.12 aA (bA)	1.38 ± 0.07 aA (bB)	1.60 ± 0.05 aA (aA)
	抗性	1.08 ± 0.05 bB (aA)	1.61 ± 0.01 aA (aA)	1.67 ± 0.10 aA (aA)	1.54 ± 0.13 aA (aA)	1.64 ± 0.12 aA (aA)
4	敏感	1.77 ± 0.16 bC (aA)	1.95 ± 0.1 bBC (bB)	2.46 ± 0.09 aA (bA)	2.40 ± 0.12 aA (bA)	2.25 ± 0.16 aAB (bB)
	抗性	2.08 ± 0.27 bB (aA)	2.81 ± 0.09 aA (aA)	2.67 ± 0.04 aA (aA)	2.83 ± 0.14 aA (aA)	2.75 ± 0.06 aA (aA)
5	敏感	1.21 ± 0.18 cB (aA)	1.44 ± 0.08 bB (bB)	2.05 ± 0.05 aA (bB)	2.07 ± 0.05 aA (bA)	1.88 ± 0.05 aA (bB)
	抗性	1.41 ± 0.07 bB (aA)	2.22 ± 0.06 aA (aA)	2.40 ± 0.12 aA (aA)	2.39 ± 0.13 aA (aA)	2.41 ± 0.12 aA (aA)

1) 相同培养时间、相同抗性菌株下,没有相同小写字母表示药剂处理浓度间差异显著($P < 0.05$),没有相同大写字母表示处理浓度间差异极显著($P < 0.01$);2) 相同培养时间、相同药剂处理浓度下,没有相同小写字母表示敏感菌株和抗性菌株差异显著($P < 0.05$),没有相同大写字母表示不同抗性菌株差异极显著($P < 0.01$)。下同。

表 3 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株谷胱甘肽-S-转移酶活性的比较

Table 3 Comparison for activity of glutathione-S-transferase between resistant-and susceptible-imidacloprid strains of *Nilaparvata lugens* endosymbiotes

处理 时间/d	菌株	药剂不同倍数处理后菌株的谷胱甘肽-S-转移酶活性/[OD·min ⁻¹ ·(mg·pro) ⁻¹]				
		250 ×	500 ×	1 000 ×	2 000 ×	0
2	敏感	0.56 ± 0.03 aA (aA)	0.62 ± 0.07 aA (aA)	0.63 ± 0.07 aA (aA)	0.64 ± 0.07 aA (aA)	0.61 ± 0.07 aA (aA)
	抗性	0.64 ± 0.07 aA (aA)	0.65 ± 0.07 aA (aA)	0.65 ± 0.07 aA (aA)	0.65 ± 0.07 aA (aA)	0.64 ± 0.07 aA (aA)
3	敏感	2.57 ± 0.16 aA (aA)	1.71 ± 0.44 bA (bA)	1.98 ± 0.37 abA (aA)	2.16 ± 0.25 abA (aA)	1.87 ± 0.44 abA (aA)
	抗性	2.93 ± 0.34 aA (aA)	2.63 ± 0.25 abA (aA)	2.32 ± 0.20 bA (aA)	2.35 ± 0.13 bA (aA)	2.6 ± 0.31 abA (aA)
4	敏感	2.31 ± 0.03 aA (aA)	2.07 ± 0.24 aA (aA)	2.19 ± 0.20 aA (aA)	2.07 ± 0.38 aA (aA)	2.18 ± 0.20 aA (aA)
	抗性	2.61 ± 0.30 aA (aA)	2.48 ± 0.12 aA (aA)	2.32 ± 0.20 aA (aA)	2.34 ± 0.10 aA (aA)	2.66 ± 0.27 aA (aA)
5	敏感	2.12 ± 0.31 aA (aA)	1.82 ± 0.48 abA (aA)	1.71 ± 0.18 abA (bA)	1.42 ± 0.11 bA (bB)	1.78 ± 0.27 abA (bA)
	抗性	2.68 ± 0.22 aA (aA)	2.56 ± 0.20 abA (aA)	2.29 ± 0.13 bA (aA)	2.28 ± 0.12 bA (aA)	2.39 ± 0.09 abA (aA)
6	敏感	1.83 ± 0.23 aA (bA)	1.59 ± 0.46 abA (aA)	1.45 ± 0.16 abA (bB)	1.17 ± 0.09 bA (bB)	1.30 ± 0.15 bA (bB)
	抗性	2.29 ± 0.14 aA (aA)	2.06 ± 0.16 aA (aA)	2.15 ± 0.10 aA (aA)	2.13 ± 0.27 aA (aA)	2.33 ± 0.10 aA (aA)

表 4 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株多功能氧化酶活性的比较

Table 4 Comparison for activity of mixed function oxidase between resistant-and susceptible-imidacloprid strains of *Nilaparvata lugens* endosymbiotes

处理 时间/d	菌株	药剂不同倍数处理后菌株的多功能氧化酶活性/[μmol·L ⁻¹ ·(mg·pro) ⁻¹ ·(30 min) ⁻¹]				
		250 ×	500 ×	1 000 ×	2 000 ×	0
2	敏感	0.37 ± 0.01 abA (bB)	0.38 ± 0.01 aA (bB)	0.38 ± 0.01 aA (bB)	0.38 ± 0.01 aA (bA)	0.36 ± 0.01 bA (bB)
	抗性	0.42 ± 0.01 aA (aA)	0.42 ± 0.01 aA (aA)	0.41 ± 0.01 aA (aA)	0.41 ± 0.01 aA (aA)	0.41 ± 0.01 aA (aA)
3	敏感	1.33 ± 0.16 aA (bB)	1.53 ± 0.22 aA (bA)	1.38 ± 0.09 aA (bB)	1.60 ± 0.35 aA (bA)	1.24 ± 0.06 aA (bB)
	抗性	2.32 ± 0.31 aA (aA)	2.33 ± 0.29 aA (aA)	2.53 ± 0.24 aA (aA)	2.35 ± 0.22 aA (aA)	2.28 ± 0.01 aA (aA)
4	敏感	1.35 ± 0.08 aA (bB)	1.40 ± 0.24 aA (bB)	1.42 ± 0.21 aA (bB)	1.55 ± 0.23 aA (bA)	1.52 ± 0.39 aA (bA)
	抗性	2.47 ± 0.26 aA (aA)	2.73 ± 0.12 aA (aA)	2.60 ± 0.28 aA (aA)	2.43 ± 0.21 aA (aA)	2.41 ± 0.34 aA (aA)
5	敏感	1.64 ± 0.31 aA (bA)	1.43 ± 0.15 aA (bB)	1.45 ± 0.28 aA (bA)	1.47 ± 0.33 aA (bB)	1.47 ± 0.32 aA (bA)
	抗性	2.29 ± 0.12 aA (aA)	2.28 ± 0.12 aA (aA)	2.29 ± 0.11 aA (aA)	2.25 ± 0.15 aA (aA)	2.32 ± 0.08 aA (aA)
6	敏感	1.64 ± 0.18 aA (bB)	1.55 ± 0.38 aA (bA)	1.48 ± 0.30 aA (bA)	1.29 ± 0.15 aA (bA)	1.52 ± 0.28 aA (bA)
	抗性	2.53 ± 0.24 aA (aA)	2.24 ± 0.15 bA (aA)	2.26 ± 0.09 abA (aA)	2.29 ± 0.01 abA (aA)	2.28 ± 0.12 abA (aA)

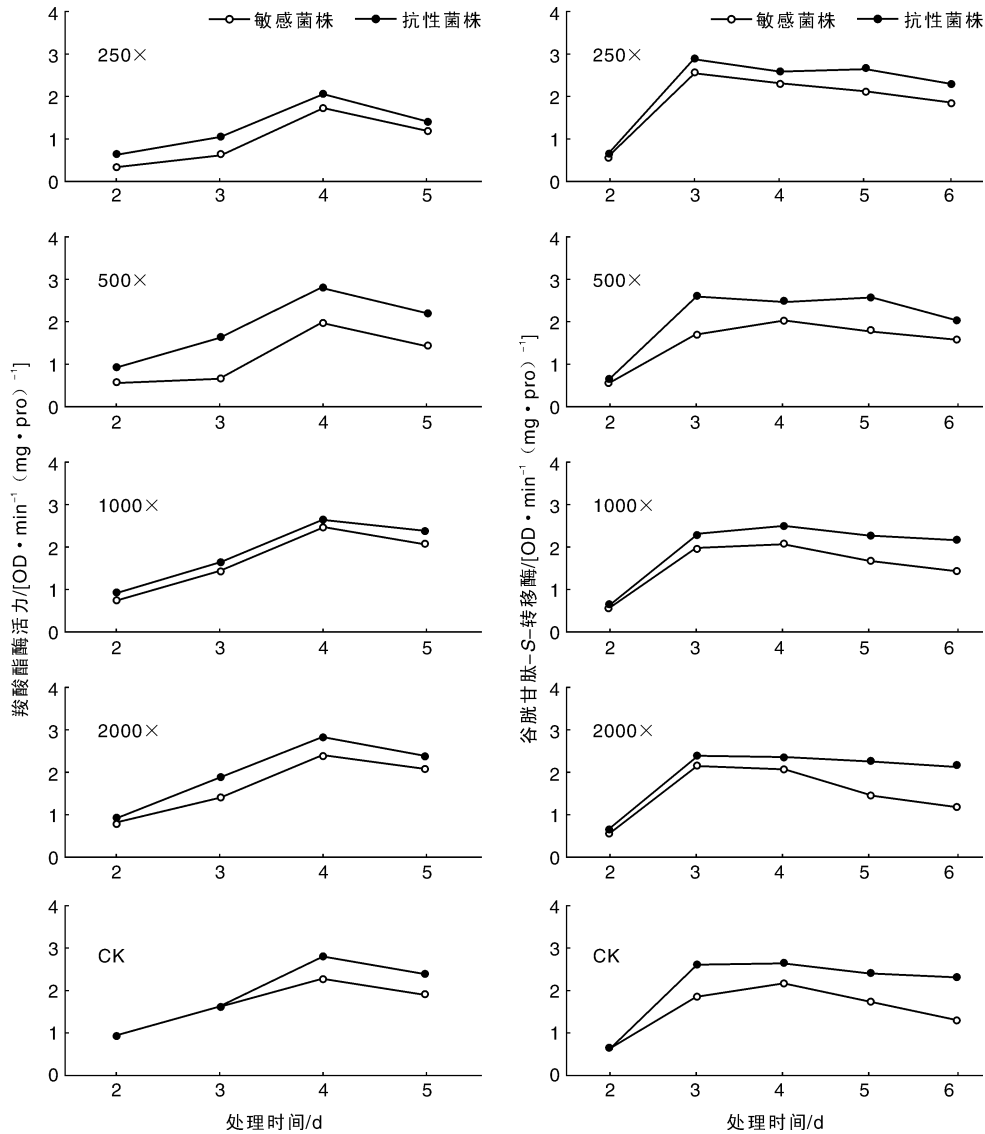


图1 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株羧酸酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶活性与培养时间的关系

Fig.1 The relationship between activity of carboxylesterase, glutathione-S-transferase of resistant-and susceptible-imidacloprid strains of *Nilaparvata lugens* endosymbionts and culture time

3 讨论

与杀虫剂代谢相关的解毒酶的解毒能力增强是生物对杀虫剂产生抗药性的主要原因之一。解毒酶是一类异质酶系(主要包括羧酸酯酶、多功能氧化酶、谷胱甘肽-S-转移酶等),能够代谢大量的内源或外源底物。其中羧酸酯酶是以水解蛋白和结合蛋白两种方式对杀虫药剂解毒,该酶活性的高低会直接影响其对杀虫药剂的抵抗。多功能氧化酶能够催化各种结构不同的内源或

外源化合物如脂肪酸、甾体激素、药物、杀虫剂及各种环境有害化合物等的氧化。谷胱甘肽-S-转移酶催化某些内源性或外来有害物质的亲电子基团与还原型谷胱甘肽的巯基偶联,增加其疏水性使其易于穿越细胞膜,分解后再转运出体外而发挥解毒作用。本研究结果表明,褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株解毒酶活性差异明显,其中抗性菌株的羧酸酯酶、多功能氧化酶活性明显高于敏感菌株,而谷胱甘肽-S-转移酶活性则无明显差异。说明在共生菌产生抗药性的过程中,共生菌体内解毒酶活性被激活,参与杀虫剂的分解

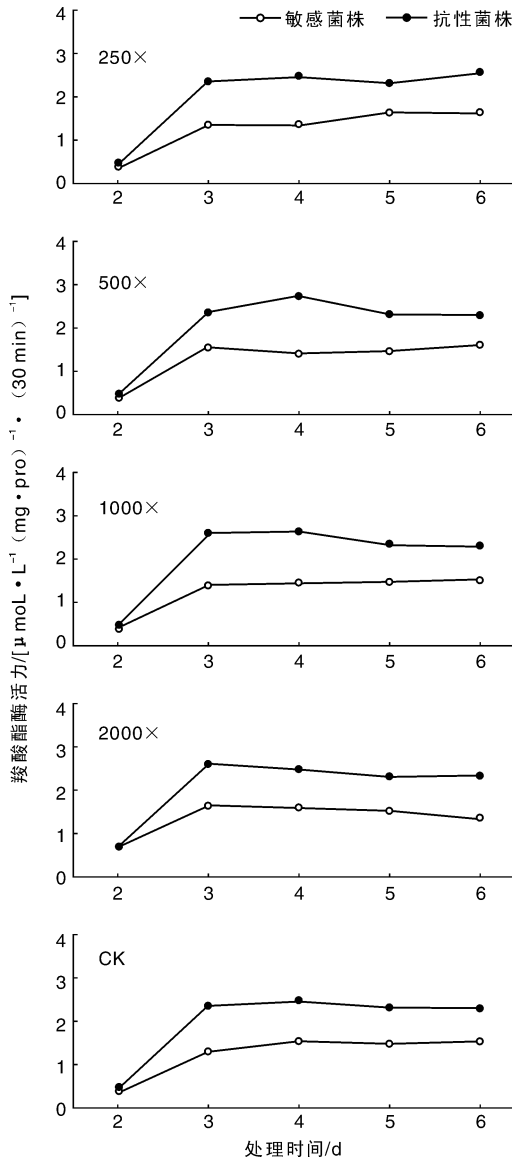


图2 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株多功能氧化酶活性与培养时间的关系

Fig.2 The relationship between mixed function oxidase activity of resistant-and susceptible-imidacloprid strains of *Nilaparvata lugens* endosymbionts and culture time

解或者是共生菌直接分泌解毒酶,参与杀虫剂的分解。

相关的研究也证明,烟草甲共生菌有帮助烟草进行解毒代谢的功能,能直接分解烟碱^[14];烟碱、印楝、甲基嘧啶磷、芸香苷等外源化合物能诱导烟草甲体内类酵母共生菌的羧酸酯酶活性,其中烟碱—柠檬酸盐处理后共生菌的酯酶活性提高172.9%,进一步用聚丙烯酰胺凝胶电泳试验显示有新的酶带产生;而在食料中直接加入结合

态烟碱来饲养烟草甲,也进一步验证了离体状态的共生菌对培养基中的结合态烟碱具有一定的分解作用。由此说明,共生菌在烟草甲对烟草的适应过程中发挥着重要的作用^[14,15]。Dowd等^[16]研究认为,这些共生菌通过对有毒物质的去毒,有益于烟草甲的存活。Shen等^[17,18]在研究烟草甲共生菌羧酸酯酶的性质、外源异生素对共生菌羧酸酯酶的影响中发现,外源异生素可以诱导共生菌羧酸酯酶活性提高。综合本文试验结果及前人的研究结果,说明褐飞虱对吡虫啉抗药性的提高,可能与其体内共生菌的羧酸酯酶、多功能氧化酶的活性变化有关。该结果可能为合理解释褐飞虱对新烟碱类杀虫剂产生抗药性的机理以及预防和治理褐飞虱的抗药性提供理论依据。

参考文献:

- [1] 中国农业技术推广服务中心药械处. 关于中晚稻褐飞虱对吡虫啉抗药性情况的通报[EB/OL]. [Http://www.asng.gov.cn/Article-Show](http://www.asng.gov.cn/Article-Show). 2005-9-28.
- [2] Liu Z, Han ZJ, Wang YC, et al. Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms [J]. *Pest Management Science*, 2003, 59: 1355-1359.
- [3] 王彦华,沈晋良,王鸣华. 褐飞虱抗药性机理及其治理研究进展[J]. *农药科学与管理*, 2005, 26(4): 24-28.
- [4] 唐振华,陶黎明,李忠. 害虫对新烟碱类杀虫剂的抗药性及其治理策略[J]. *农药学报*, 2006, 8(3): 195-202.
- [5] Liu Z, Williamson MS, Lansdell SJ, et al. A nicotinic acetylcholin e receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper) [J]. *Proceedings of National Academy Science of the United States of America*, 2005, 102: 8420-8425.
- [6] Chen CC, Cheng LL, Chen K, et al. Studies on the intracellular yeast-like symbionts in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). 1. Histological observations and population changes of the symbiont [J]. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 1981, 91: 321-327.
- [7] 傅强,张志涛,胡萃,等. 高温处理后褐飞虱体内共生酵母菌和氨基酸需求的变化[J]. *昆虫学报*, 2001, 44(4): 534-540.
- [8] Cheng DJ, Hou RF. Determination and distribution of a female-specific protein in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae) [J]. *Tissue and Cell*, 2005, 37(1): 37-45.
- [9] Sakaki T, Kawamura M, Ishikawa H. Nitrogen recycling in

- the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1996, 42(2): 125 - 129.
- [10] Wetzel JM, Ohnishi M, Fujita T, et al. Diversity in steroidogenesis of symbiotic microorganisms from planthoppers [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1992, 18: 2083 - 2094.
- [11] Lu ZX, Yu XP, Chen JM, et al. Dynamics of yeast-like symbiont and its relationship with the virulence of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, to resistant rice varieties [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2004, 7(3): 317 - 323.
- [12] 张珏锋, 陈建明, 陈法军, 等. 褐飞虱内共生菌的分离及其 26S rDNA 的部分序列分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 2211 - 2216.
- [13] 陈建明, 何月平, 张珏锋, 等. 常用杀虫剂和杀菌剂对褐飞虱类酵母共生菌生长的影响[J]. 植物保护, 2009, 35(6): 47 - 51.
- [14] 程新胜, 薛宝燕, 魏重生. 烟草甲体内类酵母共生菌与烟碱的互作效应研究[R]. 中国烟草学会 2004 年学术年会论文集, 武汉; 2004.
- [15] 薛宝燕. 食料与共生菌对烟草甲的影响及烟草甲防治技术研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2005.
- [16] Dowd PF, Shen SK. The contribution of symbiotic yeast to toxic resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricornis*) [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1990, 56: 241 - 248.
- [17] Shen SK, Dowd PF. Xenobiotic induction of esterases in cultures of the yeast-like symbiont from the cigarette beetle [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1989, 52: 179 - 184.
- [18] Shen SK, Dowd PF. 1-Naphthyl acetate esterase activity from cultures of the symbiont yeast of the cigarette beetle (Coleoptera: Anobiidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1991, 84(2): 402 - 407.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248 - 252.
- [20] Han Z, Moores G, Devonshire A, et al. Association between biochemical marks and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1998, 62: 164 - 171.
- [21] Qu M, Han Z, Xu X, et al. Triazophos resistance mechanism in rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2003, 77: 99 - 105.
- [22] Oppenorth FJ. Glutathione S transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1979, 11: 176 - 178.
- [23] Yu SJ, Ngu Yen SN. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1992, 44(1): 74 - 81.
- [24] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其计算机处理平台[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.

(责任编辑 陈华平)