

褐飞虱对甲胺磷抗性发展与解毒酶系活性的关系

刘泽文 韩召军 张玲春 (南京农业大学 农业部病虫监测与治理基础实验室, 江苏 南京 210095)

Relationship Between Methamidophos Resistance Development and Three Detoxifying Enzymes in Brown Planthopper

LIU Ze-wen, HAN Zhao-jun, ZHANG Ling-chun

(Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, P. R. China; Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Methamidophos resistance of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (BPH) was selected in laboratory. Results showed that the resistance development of BPH was approximately shaped as the letter "S": resistance change was small before the fifth generation and after the fifteenth generation, and the change was sharp between the fifth and the fifteenth generation. Esterase might play an important role in the resistance development, because the esterase activity and the number of individuals with high activities increased along with the resistance development. The esterase activities of insecticide-sensitive population, field population F_0 , and its selective generations F_5 , F_{10} and F_{15} were high correlated with the resistance ratios of these generations, and the coefficient was 0.98993. Mixed-function oxidases and glutathione S-transferase also might play some roles in the resistance development, but the big change in the activities of the two detoxifying enzymes both took place before the tenth generation.

Key words: *Nilaparvata lugens*; methamidophos; resistance to insecticide; detoxifying enzymes

摘要: 室内抗性筛选表明,褐飞虱对甲胺磷抗性的发展呈不规则的“S”形:第5代前抗性上升很慢,第5~15代间迅速上升,第15代后上升变慢。酯酶在抗药性上升中可能起着十分重要作用,随着抗性的上升,酯酶和个体酶活分布都向高活性发展。敏感种群、田间种群及其筛选世代 F_5 、 F_{10} 和 F_{15} 的酯酶活性与抗性倍数具有显著的相关性,相关系数达到 0.98993。多功能氧化酶和谷胱甘肽转移酶在抗性发展中也可能起到一定作用,但活性的上升都集中在第10代之前,第10代之后变化不大。

关键词: 褐飞虱; 甲胺磷; 抗药性; 解毒酶

中图分类号: S435.11⁺.3; S481⁺.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2003)02-0166-05

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) (brown planthopper, BPH) 是亚洲稻区危害水稻最严重的害虫之一^[1]。长期以来国内外对褐飞虱的防治主要是以化学防治为主^[2]。自日本 1969 年发现褐飞虱对丙体六六六产生抗药性^[3]以来,大量监测表明褐飞虱对许多药剂产生了抗性。我国的监测表明,20 世纪 80 年代以来,褐飞虱对甲胺磷的敏感性逐渐下降,1995 年抗药性达到 10 倍以上^[4,5]。褐飞虱抗药性产生的机理复杂,但在所有导致抗性产生的昆虫生化防御体系中,代谢因子通常起着最重要的作用^[6]。褐飞虱体内对杀虫剂代谢抗性主要是因为酯酶(羧酸酯酶)、谷胱甘肽-S-转移酶和多功能氧化酶的解毒作用增强,其中酯酶起主要作用^[7,8]。本文从室内筛选抗药性的变化、三种解毒酶活性变化和个体酶活分布变化三个方面,就褐飞虱对甲胺磷抗性产生的

过程进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

敏感种群(S):2000 年 4 月由江苏省农业科学院植物保护研究所提供多年室内饲养的褐飞虱,经室内在不接触任何农药的条件下继续饲养繁育而成。

田间种群(F_0):2000 年 7 月采集于南京市江浦县植保站试验田,是抗药性筛选的基础种群。

$F_1 \sim F_{19}$:筛选世代,第 1 代到第 19 代。

1.2 供试药剂和试剂

98.2%甲胺磷(Bayer 公司),生测实验使用;

收稿日期:2002-06-14;修改稿收到日期:2002-08-15。

第一作者简介:刘泽文(1977--),男,在读博士研究生。

72.5%甲胺磷(苏州化工厂),抗性筛选使用。 α -乙酸萘酯(α -NA)(化学纯,上海试剂一厂),固蓝 RR 盐(Fluka 产品),2,4 二硝基氯苯(CDNB)(化学纯,上海试剂一厂),还原型谷胱甘肽(GSH)(Sigma 进口分装),对硝基苯甲醚(p -NA)(分析纯,北京化工厂),还原型辅酶 I 四钠盐(NADPH Na₄)(Sigma 产品),对硝基苯酚(分析纯,江苏省吴江市青云精细化工厂)。

1.3 毒力测定方法

参照 Nagata^[2]的方法并加以改进。供试昆虫用 CO₂ 麻醉 15 s,然后用手动微量点滴器(Burkard Manufacturing Co. Ltd, Richmansworth England, 使用体积为 0.0403 μ L)将药液点滴在长翅型雌成虫的前胸背板上。每个药剂均用丙酮稀释成 5~6 个浓度,每个浓度处理 30 头,重复 3 次,用丙酮做对照。处理后的试虫倾入到装有无土栽培水稻的饲养杯中,每个饲养杯放 15 头;然后将饲养杯放在(25 \pm 1) $^{\circ}$ C 的光照培养箱内,光照周期(光照/黑暗)为 16 h/8 h,相对湿度为 70%~80%。饲养 24 h 后检查结果。按照几率值分析法计算毒力回归曲线(LD- p line)和致死中量(LD₅₀),并计算抗性倍数(resistance ratio, RR)。RR=某个品系的 LD₅₀/敏感品系的 LD₅₀。

1.4 抗性筛选方法

参照刘泽文等^[9]的方法进行抗药性筛选。将无土培育的秧苗放入筛选笼中,接入 100~200 头 3 龄若虫,待试虫在幼苗上适应 2 h 后,用手提式喷雾器对虫体和秧苗喷雾 30 s。喷雾完毕后,将秧苗连飞虱放在(28 \pm 1) $^{\circ}$ C、16 h 光照条件下饲养,3 d 后将存活试虫移入恢复笼内继续饲养。

1.5 酯酶活性测定

参照 Han 等^[10]的方法。取羽化当天的长翅型雌虫 1 头,用 0.5 mL 磷酸缓冲液(0.02 mol/L, pH=7.0)匀浆,然后在 4000 \times g、4 $^{\circ}$ C 下离心 15 min,取上清液作酯酶酶液。取 100 μ L 酶液加到酶标板孔中,然后再加入 100 μ L 的 α -醋酸萘酯(2 mmol/L)和固蓝 RR 盐(1.5 mmol/L)混合液,在酶标仪上 450 nm 处测 OD 值。

1.6 谷胱甘肽-S-转移酶活性测定

参照 Kao 等^[11]方法,取羽化当天的长翅型雌虫 1 头在 1 mL Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.0, 含 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽)中匀浆,然后在 10 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 下离心 15 min,取上清液作酶液。取 100 μ L 酶液,加 1.4 mL Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L,

pH 8.0),在 25 $^{\circ}$ C 下保温 5 min,加 60 μ L 30 mmol/L CDNB(丙酮配制),在 752 紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂)上 340 nm 处测 OD 值。

1.7 多功能氧化酶活性测定

参照 Hung 和 Sun 方法^[12],并加以改进。取羽化当天的长翅型雌虫 1 头在 2 mL 磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.8)中充分匀浆,然后在 10 000 \times g、0 $^{\circ}$ C 下离心 15 min,取上清液作酶液备用。将 1 mL 酶液、0.5 mL NADPH (1 mmol/L, 缓冲液配制)、0.1 mL 对硝基苯甲醚(0.1 mmol/L, 缓冲液配制)和 2.5 mL 缓冲液依次加入试管内,置于 34 $^{\circ}$ C 恒温气浴摇床中振荡 30 min,然后加 1 mL 1 mol/L HCl 终止反应。往试管中加入 5 mL 乙醚萃取,分层后在氯仿层移取 3 mL 到另一试管内,加入 3 mL 0.5 mol/L NaOH 萃取。取 NaOH 溶液层 2 mL 置于比色皿中,在 400 nm 处测定 OD 值。用对硝基苯酚制作标准曲线,根据所测定的 OD 值,在标准曲线上计算产物生成量。

2 结果与分析

2.1 抗性筛选中褐飞虱对甲胺磷敏感性的变化

从图 1 和表 1 可以看出,不同的筛选世代抗性发展存在很大的差异,整个筛选过程基本呈现“慢—快—慢”的近似“S”形发展。从筛选的第 1 代到第 4 代,抗性发展缓慢,每代抗性平均上升 2.19 倍。从第 5 代开始,抗性迅速上升,直到第 15 代,平均每代抗性上升 16.61 倍;第 15 代后,抗性上升速度下降,每代平均上升 1.78 倍,尤其是第 18 代与第 19 代之间,抗性才上升了 0.85 倍。 b 值的变化呈先下降后

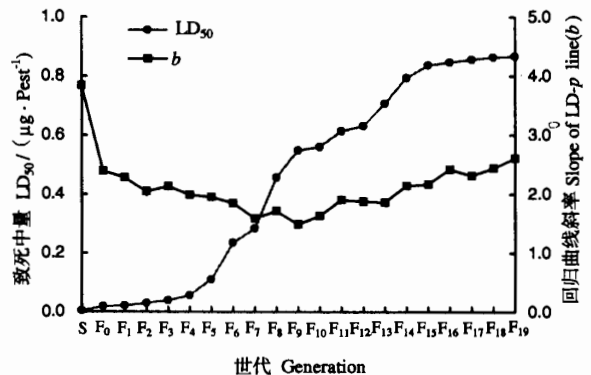


图 1 致死中量(LD₅₀)和回归曲线的斜率(b)随筛选世代的变化情况

Fig. 1. Changes of LD₅₀ and b data over the selection generations.

LD₅₀—The dose killing 50 percentage of the population in one test; b —The slope of the LD- p line.

表 1 筛选过程中褐飞虱对甲胺磷抗性的变化
Table 1. Changes of the resistance in BPH selected with methamidophos.

世代 Generation	毒力回归线 LD- <i>p</i> line	LD ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{pest}^{-1}$)	抗性倍数 RR
S	$y = 14.1022 + 3.8413x$	0.0043	1.00
F ₀	$y = 9.1069 + 2.3958x$	0.0193	4.52
F ₁	$y = 8.8235 + 2.2817x$	0.0211	4.95
F ₂	$y = 8.1029 + 2.0472x$	0.0305	7.14
F ₃	$y = 7.9854 + 2.1306x$	0.0397	9.30
F ₄	$y = 7.4775 + 1.9877x$	0.0567	13.28
F ₅	$y = 6.8601 + 1.9532x$	0.1116	26.13
F ₆	$y = 6.1583 + 1.8476x$	0.2361	55.29
F ₇	$y = 5.8663 + 1.5851x$	0.2841	66.54
F ₈	$y = 5.5846 + 1.7146x$	0.4561	106.82
F ₉	$y = 5.3884 + 1.4917x$	0.5491	128.59
F ₁₀	$y = 5.4098 + 1.6293x$	0.5604	131.25
F ₁₁	$y = 5.4029 + 1.9038x$	0.6143	143.86
F ₁₂	$y = 5.3742 + 1.8740x$	0.6314	147.87
F ₁₃	$y = 5.2804 + 1.8611x$	0.7069	165.54
F ₁₄	$y = 5.2138 + 2.1427x$	0.7947	186.12
F ₁₅	$y = 5.1676 + 2.1692x$	0.8370	196.02
F ₁₆	$y = 5.1746 + 2.4247x$	0.8472	198.40
F ₁₇	$y = 5.1562 + 2.3160x$	0.8562	200.51
F ₁₈	$y = 5.1555 + 2.4441x$	0.8637	202.27
F ₁₉	$y = 5.1615 + 2.6123x$	0.8673	203.12

S—Susceptible population; RR—Resistance ratio.

上升的趋势,以第 9 代的 *b* 值(1.4917)最小,而刚开始筛选和 14 代后抗性上升速度下降时的 *b* 值都较大,F₀、F₁、F₁₈ 和 F₁₉ 的 *b* 值分别为第 9 代 *b* 值的 1.51、1.53、1.64 和 1.75 倍。

2.2 三种解毒酶系活性的变化

表 2 列出了田间种群和筛选第 5、10、15 代 3 种解毒酶的活性,并与敏感种群和田间种群进行了对

比。田间种群 3 种解毒酶活性都比敏感种群高,这可能是田间种群具有一定水平抗药性的原因。筛选过程中,酯酶活性的变化在各代间差异很大,但与抗性发展存在很好的一致性,所测定几代的相关系数达到 0.98993,显著性测验表明该相关性达到极显著水平($t = 12.110 > t_{0.01} = 9.925$)。与田间品系相比,F₅ 酯酶活性上升较小,比 F₀ 上升了 3.238 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$;平均每代上升 0.648 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$;F₁₀ 酯酶上升很大,比 F₅ 高 6.577 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$,平均每代上升 1.315 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$;在 F₁₀ 基础上,F₁₅ 的酯酶活性上升很小,仅上升了 3.467 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$,平均每代上升 0.693 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。筛选过程中,多功能氧化酶和谷胱甘肽转移酶的变化都不太大,而且酶活的变化基本上发生在 F₁₀ 之前,F₁₀ 与 F₁₅ 之间酶活的变化都很小。将 3 个筛选世代的 3 种解毒酶活性与敏感品系的活性比值相乘,则乘积与抗性倍数存在很好的相关性,相关系数为 0.99989,显著性测验表明该相关性极显著($t = 118.653 > t_{0.01} = 9.925$);同时计算了 3 个比值之和与抗性倍数的相关性,相关系数为 0.98232,显著性测验表明该相关性在 0.05 水平上是显著的,但在 0.01 水平上不显著($t_{0.05} = 4.303 < t = 9.089 < t_{0.01} = 9.925$);对这两个相关系数进行差异显著性测验,发现它们在 0.05 水平上存在显著差异($t = 3.139 > t_{0.05} = 2.776$)。由此推断,3 个解毒酶之间可能是相乘关系,而不是相加关系,或者说相乘关系更能解释解毒酶活性变化导致褐飞虱抗药性的变化。

2.3 解毒酶系活性个体分布的变化

从图 2 可以看出,随着抗药性的上升,褐飞虱

表 2 筛选过程中褐飞虱体内 3 种解毒酶活性的变化

Table 2. Changes of the activities of esterase, mixed-function oxidases (MFO) and glutathione S-transferase (GSTs) in BPH selected with methamidophos.

解毒酶 Detoxifying enzyme	敏感品系 S	田间种群 F ₀	筛选 5 代 F ₅	筛选 10 代 F ₁₀	筛选 15 代 F ₁₅
酯酶活性 Esterase/($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	0.951±0.076 a	1.543±0.154 a	4.781±1.152 b	11.358±2.166 c	14.825±1.917 d
比值 Ratio	1.00	1.62	5.03	11.94	15.58
多功能氧化酶活性 MFO/($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	2.365±0.307 a	3.517±0.422 b	5.124±0.750 c	6.523±0.816 cd	7.116±1.013 d
比值 Ratio	1.00	1.49	2.17	2.76	3.01
谷胱甘肽转移酶活性 GSTs/($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	104.197±7.442 a	161.531±13.675 ab	218.740±18.721 b	352.508±21.063 c	378.450±15.177 c
比值 Ratio	1.00	1.55	2.10	3.38	3.63
比值乘积 Product of ratios	1.00	4.20	22.89	111.41	170.27
比值和 Sum of ratios	3.00	4.66	9.29	18.08	22.23
抗性倍数 RR	1.00	4.52	26.13	131.25	196.02

注:比值指田间种群或筛选的第 5、10、15 代的某个解毒酶活性与敏感品系活性之比;同一横栏中带不同字母者表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: Ratio is the result of the division of the activity of one detoxifying enzyme of F₀, F₅, F₁₀ or F₁₅ by that of S; Different letters in the same row showed significant difference at 0.05 level.

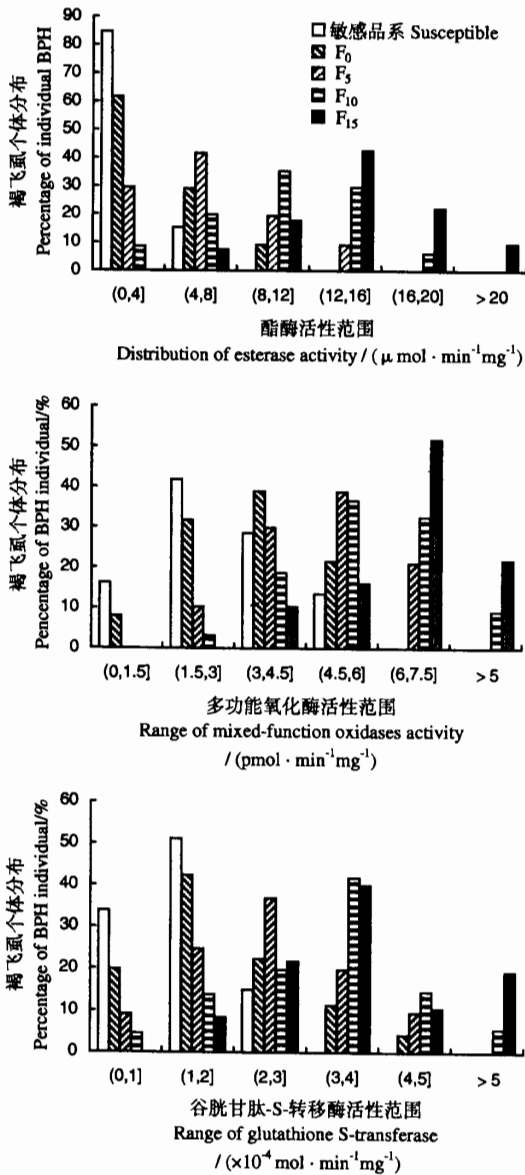


图2 解毒酶活性不同的个体的分布
Fig. 2. Distribution of insects with different activities of the detoxifying enzymes.

具有不同酯酶活性个体的分布发生了很大变化。F₅与F₀相比,没有发生很大的变化,绝大部分仍然分布在0~8 μmol/(min · mg)范围内;而F₁₀变化很大,主分布区为8~16 μmol/(min · mg),在12~16 μmol/(min · mg)范围内的分布达到29.83%;F₁₅进一步向高酯酶活性区域扩展,主分布区为12~20 μmol/(min · mg),在16~20 μmol/(min · mg)范围内分布达到22.33%。

在多功能氧化酶方面,S与F₀的分布很相似,

不存在很大差异。从F₀到F₁₅,酶活分布都在向高活性区域扩展,主分布区依次上升,分别为1.5~4.5 pmol/(min · mg)、3~6 pmol/(min · mg)、4.5~7.5 pmol/(min · mg)和>6 pmol/(min · mg)。

GSTs的分布中,F₀和S存在很大的差异,F₀的分布范围更广,3×10⁻⁴~5×10⁻⁴ mol/(min · mg)的范围内都有一定分布。F₅和F₀的差异较小,主分布区都为1×10⁻⁴~3×10⁻⁴ mol/(min · mg);F₁₀与F₅差异较大,F₁₀的主分布区为3×10⁻¹⁰~4×10⁻⁴ mol/(min · mg);F₁₀和F₁₅差异很小,基本上是同域分布。

3 讨论

室内抗药性筛选结果表明,褐飞虱对甲胺磷的抗性的发展并不是匀速直线上升的,而是“慢—快—慢”的近似“S”形上升。b值呈现“大—小—大”的变化趋势,反映出抗性筛选过程中筛选种群同质性的变化规律。刚开始筛选时,同质性较高;随着抗性的筛选,同质性下降,种群中抗性个体不断出现;进一步筛选导致抗性个体大量积累,敏感个体逐渐被淘汰,同质性上升。3个解毒酶活性的变化在抗性发展中都可能起到不同程度的作用,比值乘积、比值和与抗性相关系数的对比分析表明3个解毒酶在抗性发展中可能是相乘关系,因为相乘关系更能解释解毒酶活性的较小变化与抗性较大上升之间的关系。当然,要证实这个相乘关系还需要进一步的研究,因为还可能存在其他影响抗性发展的因素。如果相乘关系的推断成立,那么在分析抗性变化机理中,就不能忽视解毒酶活性的微小变化,因为这个微小变化可能会导致乘积的较大变化,最终可能导致抗性的迅速上升。

羧酸酯酶在褐飞虱对有机磷抗性中起十分重要的作用,自Ozaki于1969年首次报道稻飞虱抗有机磷个体中羧酸酯酶活性特别高^[13]以来,大量研究表明褐飞虱对有机磷的抗性与酯酶密切相关^[14,15]。邓业成等研究发现抗马拉硫磷褐飞虱品系羧酸酯酶活性和具有高酯酶活性的个体数都明显高于敏感品系,抗性上升与羧酸酯酶活性的变化存在一定的相关性,相关系数达0.93^[16],这与本文的研究十分一致。所以,酯酶活性的上升可能是褐飞虱对甲胺磷抗性发展的主要原因之一,其他两个解毒酶活性的变化可能促进了抗性的发展。

谢辞:本实验室王荫长教授对数据分析提出了

宝贵意见,日本茨城大学 Toru Nagata 教授友情提供了 98.2%甲胺磷、手动微量点滴器、饲养杯等,98级本科生董钊同学和 2000 级本科生张晓敏同学在昆虫饲养和抗药性筛选中给予热情帮助,特致谢意!

参考文献:

- 1 Wu G R (巫国瑞), Hu C (胡 萃), Xu S P (许绍朴). Planthoppers (稻飞虱). Beijing: Agricultural Press (农业出版社), 1987. 30—36. (in Chinese)
- 2 Nagata T. Insecticide resistance and chemical control of the rice planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Bull Kyushu National Agri Exp*, 1982, 22 (1): 49—164.
- 3 Nagata T, Moriya S. Resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål), to Lindane. *Jap J Appl Ent Zool*, 1974, 18: 73—80.
- 4 Wang Y C (王荫长), Li G Q (李国清), Ding S Y (丁示银), et al. The variation of resistance levels of *Nilaparvata lugens* to conventional insecticides among years. *J Nanjing Agri Univ* (南京农业大学学报), 1996, 19: 1—8. (in Chinese with English abstract)
- 5 Liu X J (刘贤进), Gu Z Y (顾正远). Monitoring and selection of insecticide resistance of the brown planthopper to methamidophos and buprofezin. *Plant Prot* (植物保护), 1996, 22 (2): 3—6. (in Chinese with English abstract)
- 6 Oppenoorth F J, Welling W. Biochemistry and physiology of resistance. In: Wilkinson C F. *Insecticide Biochemistry and Physiology*. New York: Plenum Press, 1976. 507—551.
- 7 Hung C F, Kao C H, Liu C C, et al. Detoxifying enzymes of selected insect species with chewing and sucking habits. *J Econ Entomol*, 1990, 83(2): 361—365.
- 8 Gu C J, Chen W L. Detoxifying enzymes of the brown planthopper (BPH). *IRRN*, 1993, 18(3): 37.
- 9 Liu Z W (刘泽文), Han Z J (韩召军), Zhang L C (张玲春), et al. Methods for insect raising and insecticide resistance selection with rice planthoppers. *Chinese J Rice Sci* (中国水稻科学), 2002, 16(2): 167—170. (in Chinese with English abstract)
- 10 Han Z J, Moores G D, Jan D, et al. Association between biochemical marks and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Pestic Biochem Physiol*, 1998, 62(3): 164—171.
- 11 Kao C H, Fu C, Sun C N. Parathion and methyl parathion resistance indiamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae. *Econ Entom*, 1989, 82: 1299—1304.
- 12 Hung C F, Sun C N. Microsomal monooxygenases in diamondback moth larvae resistant to fenvalerate and piperonyl butoxide. *Pestic Biochem Physiol*, 1989, 33: 168—175.
- 13 Ozaki K. The resistance to organophosphorus of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*, and the smaller brown planthopper. *Rev Plant Prot Res*, 1969, 2: 1—13.
- 14 Kim J W, Hwang T G. Studies on resistance to organophosphorus insecticides in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). II. Difference of the biochemical characteristic. *Korean J Plant Protect*, 1987, 26(3): 165—170.
- 15 Ghorpade S A. Esterase activity and associated resistance of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) to insecticides. *J Insect Sci*, 1990, 3(2): 152—157.
- 16 Deng Y C (邓业成), Wang Y C (王荫长), Tan F J (谭福杰). The relation between malathion resistance and esterases in brown planthopper. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 1995, 8(4): 740—748. (in Chinese with English abstract)