

• 研究论文 •

抗性甜菜夜蛾 NaK-ATP酶、Ca-ATP酶和 CaMg-ATP酶对高效氯氟氰菊酯的敏感性

伦才智¹, 李艳伟¹, 刘永杰^{*}, 沈晋良², 束怀瑞³

(1. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018 2 南京农业大学 农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 江苏 南京 210095 3 山东农业大学 园艺学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 分别测定了甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 敏感和抗高效氯氟氰菊酯品系神经系统 NaK-ATP酶、Ca-ATP酶和 CaMg-ATP酶的活力。结果表明, 敏感和抗性品系 NaK-ATP酶活力差异不显著, 而抗性品系 Ca-ATP酶和 CaMg-ATP酶活力明显低于敏感品系。在浓度为 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L 时, 高效氯氟氰菊酯对敏感和抗性品系 NaK-ATP酶、Ca-ATP酶和 CaMg-ATP酶的活力均有抑制, 并且对敏感品系的抑制作用高于对抗性品系。高效氯氟氰菊酯浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 时, 对敏感品系 NaK-ATP酶活力的抑制率为 29.6%, 对抗性品系的为 21.8%, 对敏感品系 Ca-ATP酶活力的抑制率为 34.3%, 对抗性品系为 21.9%, 对敏感品系 CaMg-ATP酶活力的抑制率为 22.3%, 对抗性品系为 16.9%, 存在显著差异。表明甜菜夜蛾抗性品系上述 3 种 ATP酶对高效氯氟氰菊酯的敏感性已明显下降。

关键词: 甜菜夜蛾; 高效氯氟氰菊酯; NaK-ATP酶; Ca-ATP酶; CaMg-ATP酶; 敏感性

中图分类号: S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)04-0335-04

Sensitivity of Nerve NaK-ATPase, Ca-ATPase and CaMg-ATPase in Resistant Strains of *Spodoptera exigua* to lambda-Cyhalothrin

LUN Cai-zhi¹, LI Yan-wei¹, LIU Yong-jie^{*}, SHEN Jin-liang², SHU Hua-rui³

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2 Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3 College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract The activity of NaK-ATPase, Ca-ATPase and CaMg-ATPase in susceptible and lambda-cyhalothrin resistant strains of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, were determined. The results indicated that there was no significant difference in NaK-ATPase activity between the two strains, but the activity of Ca-ATPase and CaMg-ATPase were much lower in resistant strain than in susceptible strain. Lambda-cyhalothrin at concentrations of $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L inhibited obviously the three mentioned above ATPase activities in two strains, and the inhibition was higher in susceptible strain than in resistant strain. For example, at concentration of 1.0×10^{-4} mol/L, the inhibition on Na-

收稿日期: 2006-07-03 修回日期: 2006-11-03.

作者简介: 伦才智 (1983-), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 刘永杰 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要从事害虫抗药性与杀虫剂毒理学研究. 联系电话: 0538-8248227; E-mail: ly@sdau.edu.cn

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2001BA509B08).

K-ATPase, Ca-ATPase and Ca-Mg-ATPase activities was 29.6%, 34.3% and 22.3% in susceptible strain and 21.8%, 21.9% and 16.9% in resistant strain, respectively. The results showed that the sensitivity of these three ATPases to lambda-cyhalothrin in resistant strain were decreased.

Key words *Spodoptera exigua*; lambda-cyhalothrin; Na-K-ATPase; Ca-ATPase; Ca-Mg-ATPase; sensitivity

昆虫神经系统信号传导是由神经膜内外不同离子浓度发生连续变化而进行的,神经膜内外不同离子浓度的维持主要靠神经膜上的ATP酶调节,其中Na-K-ATP酶、Ca-ATP酶和Ca-Mg-ATP酶对神经膜内外离子浓度的调节起着重要作用^[1,2]。拟除虫菊酯类杀虫剂的主要作用靶标是神经膜上的钠离子通道和上述3种ATP酶^[3,4],钠离子通道变异和神经系统ATP酶活性的下降是导致害虫产生抗药性的重要原因^[5~8]。有关拟除虫菊酯类杀虫剂与害虫神经系统ATP酶抗性关系的研究,以往主要集中在家蝇 *Musca domestica*、蜚蠊 *Blattella germanica* 等卫生害虫上,涉及农业害虫方面的很少^[5,7,9]。

目前已报道多种害虫对拟除虫菊酯类杀虫剂产生了不同程度的抗性,有些甚至达到了高水平或极高水平。我国多数地区的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 对拟除虫菊酯类杀虫剂已处于中等至高水平抗性阶段,该类杀虫剂基本上已不能有效防治甜菜夜蛾^[10]。有研究证实甜菜夜蛾对高效氯氟氰菊酯的抗性 with 表皮穿透率降低^[11]和多功能氧化酶活性提高有关^[12],但是否还涉及神经系统ATP酶活性的下降尚不清楚。为明确该问题,笔者测定并比较了甜菜夜蛾敏感和抗性品系神经系统3种ATP酶对高效氯氟氰菊酯的敏感性,以进一步了解其抗性机理。

1 材料与方法

1.1 供试甜菜夜蛾

敏感品系(S):由湖北武汉科诺生物技术有限公司提供,在室内未接触任何药剂的情况下用人工饲料连续饲养十多年。在本实验室用人工饲料继续饲养供试。

抗性品系(R):2001年9月采自江苏南京市江浦大禹生物技术有限公司园艺场甜菜田,对高效氯氟氰菊酯属高水平抗性,在室内用点滴法汰选3龄幼虫多代后抗性达到5000倍以上。之后每饲养3~5代再筛选1次,以保持抗性的稳定。

1.2 供试药剂

97.0%的高效氯氟氰菊酯(lambda-cyhalothrin)原药(南京红太阳集团公司第一农药厂);水溶性聚蔗糖(Fico II-400)(Pharmacia Inc.产品);乌本苷(Quabain)和考马斯亮蓝G-250(Fluka Chemical Co.产品);ATP(Adenosine triphosphate)钠盐(Amresco产品);乙二胺四乙酸(EDTA)(上海试剂一厂);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 酶源制备

参照Feng等^[9]和何运转等^[13]方法。用低温速冻、振荡过筛的方法分离和收集甜菜夜蛾成虫头部,称重后加入10倍体积的缓冲液(pH=7.4,含0.1 mol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 0.25 mol/L 蔗糖),研磨、匀浆,3200×g、4℃下离心10 min,取上清液,再在13000×g、4℃下离心30 min,取沉淀部分。用6 mL 0.25 mol/L 蔗糖缓冲液悬浮,在30000×g、4℃下,用质量分数为18%和4%、按1:1(体积比)组成的Fico II蔗糖溶液梯度离心60 min,小心取出4%、18%界面间的悬浮物,按1:3的比例加入10 mmol/L Tris-HCl(pH=7.4)缓冲液,16000×g、4℃下离心20 min,沉淀物用10 mmol/L Tris-HCl缓冲液悬浮,稀释至所需浓度作酶源备用。

1.4 ATP酶活力测定

1.4.1 Na-K-ATP酶活力测定 参照冯北元^[14]、何运转等^[13]方法。设反应总体积为100 μL,分3组同时进行,每组反应体系中均含有50 mmol/L Tris-HCl 10~12 μg 蛋白质酶液、5 mmol/L MgCl₂,不同之处为:I组含有160 mmol/L NaCl,20 mmol/L KCl;II组含有0.5 mmol/L Ouabain;III组为对照。在37℃水浴中预保温5 min,加底物ATP(在反应体系中的浓度为0.5 mmol/L,下同),于37℃水浴中反应5 min,加50 μL质量分数为15%的三氯乙酸终止反应。按冯北元^[14]方法染色,在分光光度计625 nm处测OD值,求出反应中生成的无机磷的量,计算ATP酶活力。每组重复3次。数据用DMRT进行分析(下同)。

1.4.2 Ca-ATP酶和Ca-Mg-ATP酶活力测定 参照何运转等^[7]方法。设反应总体积为100 μL,各分

两组同时进行。Ca-ATP酶测定体系中均含有 50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L CaCl₂, 10~15 μg 蛋白质酶液和 0.5 mmol/L Ouabain。Ca-M g-ATP酶反应体系中均含有 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L CaCl₂, 100 mmol/L KCl和 0.5 mmol/L Ouabain。

将两组试管放入 37℃水浴中预保温 5 min, 加底物 ATP, 于 37℃水浴中反应 5 min, 其中一组试管中加入 50 μL 15% 的三氯乙酸终止反应。用去离子水将各试管反应液补至 1 mL。ATP酶活力测定及计算方法同 1.4.1 节, 每组重复 3 次。

1.4.3 药剂对 3 种 ATP 酶活力的抑制作用 将高效氯氟氰菊酯用乙醇配成一定浓度的母液, 实验前用去离子水稀释至所需的 6 个系列浓度 ($1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L)。3 种 ATP 酶活力测

定反应体系同上, 分别加入 1 μL 不同浓度的高效氯氟氰菊酯, 于 37℃水浴中预保温 5 min 后再加入 ATP 反应。以不加农药的乙醇水溶液为对照。ATP酶活力测定与计算方法同上。

1.4.4 蛋白质含量测定 按 Bradford^[15]方法进行。

2 结果与分析

2.1 敏感和抗性品系 3 种 ATP 酶活力

结果 (见表 1) 表明, 敏感和抗性品系之间 Na-K-ATP酶的活力差异不显著, 而抗性品系 Ca-ATP酶和 Ca-M g-ATP酶的活力明显低于敏感品系, 差异显著。说明抗性品系后两种 ATP 酶的敏感性已经下降, 其敏感性降低可能与甜菜夜蛾对高效氯氟氰菊酯的抗性有关。

Table 1 Na-K-ATPase, Ca-ATPase and Ca-M g-ATPase activity in susceptible and resistant strains of *S. exigua*

ATPases	Susceptible strain	Resistant strain	R/S
	/(nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	/(nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	
Na-K-ATPase	663.78±11.12 a*	631.25±9.08 a	1.05
Ca-ATPase	637.09±24.36 a	465.82±20.56 b	1.37
Ca-M g-ATPase	586.49±15.28 a	479.31±18.65 b	1.22

* Means in the same line followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$) by DMRT.

2.2 药剂对抗性和敏感品系 3 种 ATP 酶活力的抑制作用

结果 (见图 1~3) 表明, 在浓度为 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L 时, 高效氯氟氰菊酯对抗性和敏感品系 3 种 ATP 酶活力均有抑制作用, 并且对敏感品系的抑制作用高于对抗性品系。如当药剂浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 时, 对敏感品系 Na-K-ATP酶活力的抑制率为 29.6%, 对抗性品系的为 21.8%; 对敏感品系 Ca-ATP酶活力的抑制率为 34.3%, 对抗性品系为 21.9%; 对敏感品系 Ca-M g-ATP酶活力的抑制率为 22.3%, 对抗性品系为 16.9%。这进一步表明甜菜夜蛾抗性品系 3 种 ATP 酶对高效氯氟氰菊酯的敏感性已明显下降。

3 讨论

昆虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性机理主要包括其表皮对杀虫剂的穿透率降低、解毒代谢作用增强及靶标部位敏感性下降 3 个方面。导致靶

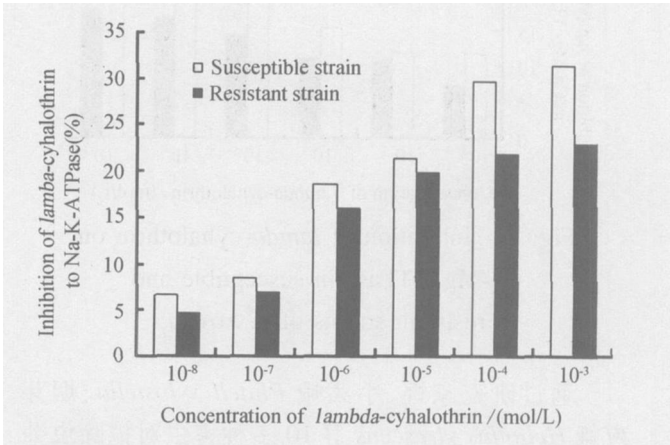


Fig. 1 Inhibition of lambda-cyhalothrin on nerve Na-K-ATPase in susceptible and resistant strains of *S. exigua*

标部位敏感性下降的主要原因是昆虫神经系统钠离子通道变异和 ATP 酶敏感性降低^[4~8]。Na-K-ATP酶起主动运输 Na⁺、K⁺ 的作用, 与钠离子通道密切相关。本研究结果表明, 甜菜夜蛾抗性与敏感品系 Na-K-ATP酶活性无明显差异, 说明抗性

品系神经系统中钠离子通道数量没有减少^[13]。高效氯氟氰菊酯对敏感和抗性品系 Na-K-ATP 酶、Ca-ATP 酶和 Ca-Mg-ATP 酶活力的抑制作用存在显著差异, 抗性品系 3 种 ATP 酶对高效氯氟氰菊酯的敏感性明显降低, 这可能是其产生抗性的原因之一。这一结果与对抗拟除虫菊酯类杀虫剂的家蝇、蜚蠊等害虫 ATP 酶活性的研究结果基本一致^[5, 7, 9, 16]。

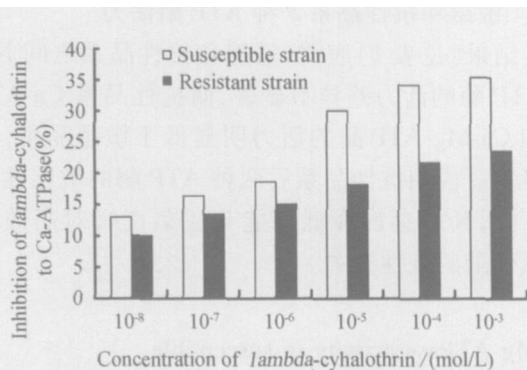


Fig 2 Inhibition of lambda-cyhalothrin on Ca-ATPase in susceptible and resistant strains of *S. exigua*

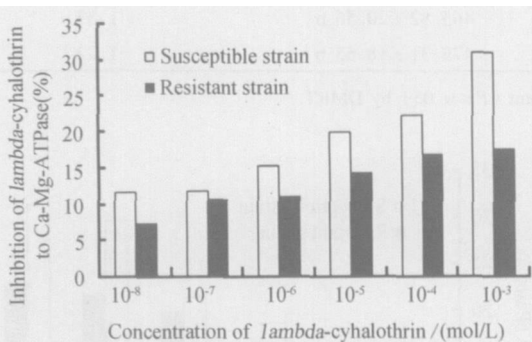


Fig 3 Inhibition of lambda-cyhalothrin on Ca-Mg-ATPase in susceptible and resistant strains of *S. exigua*

通过研究家蝇、小菜蛾 *Plutella xylostella*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等 10 多种害虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性机理发现, 其抗性还与钠离子通道的敏感性下降密切相关, 并且发现引起钠离子通道敏感性下降的主要原因是编码钠离子通道 α 功能亚基的基因发生点突变, 造成 α 功能亚基氨基酸发生改变, 影响了其结合能力, 从而导致敏感性下降^[8]。至于甜菜夜蛾对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性是否与钠离子通道的敏感性下降有关, 还需要通过克隆测序分析甜菜夜蛾抗性和敏感品系钠离子通道蛋白基因是否发生突变来确认。

参考文献:

- [1] Skou J C. The Na-K-ATPase [J]. J Bioenergetics Biomembranes, 1992, 24(3): 249-261.
- [2] Clark J M, Matsumura F. The action of two classes of pyrethroids on the inhibition of brain Na-Ca and Ca-Mg-ATPase hydrolyzing activities of the american cockroach [J]. Comp Biochem Physiol, 1987, 86C: 135-145.
- [3] JIANG Zhisheng (蒋志胜), SHANG Zhizhen (尚志珍), WANG Xiaobo (王小波), et al. 美洲大蠊 Na⁺-K⁺-ATP 酶作为筛选靶标的初步研究 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2000, 2(4): 28-32.
- [4] TANG Zhen-hua (唐振华), BI Qiang (毕强). Molecular Behavior of Insecticide Action (杀虫剂作用的分子行为) [M]. Shanghai (上海): Shanghai Far East Publishers (上海远东出版社), 2003. 327-345.
- [5] Rashatwar S, Matsumura F. Reduced calcium sensitivity of the sodium channel and the Na⁺/Ca²⁺ exchange system in the kdr-type DDT and pyrethroid resistant German cockroach *Blattella germanica* [J]. Comp Biochem Physiol, 1985, 81C: 97-103.
- [6] TIAN Yu (田雨), LENG Xin-fu (冷欣夫). 溴氰菊酯对不同品系家蝇脑突触体膜蛋白磷酸化及酶活性的影响 [J]. Acta Entomol Sinica (昆虫学报), 1999, 42(2): 113-119.
- [7] HE Yun-zhuan (何运转), LIM ei (李梅), HE Feng-qin (何凤琴), et al. 拟除虫菊酯对家蝇 Ca-ATP 酶 Ca-Mg-ATP 酶的抑制作用 [J]. Acta Entomol Sinica (昆虫学报), 2001, 44(3): 297-303.
- [8] TANG Zhen-hua (唐振华), YUAN Jian-zhong (袁建中), ZHUANG Pei-jun (庄佩君), et al. 昆虫钠通道的结构和与击倒抗性有关的基因突变 [J]. Acta Entomol Sinica (昆虫学报), 2004, 47(6): 830-836.
- [9] Feng G L, Jacques R M, Clark J M. Suppression of pyrethroid-dependent neurotransmitter release from synaptosomes of knockdown-resistant house flies under pulsed-depolarization condition during continuous perfusion [J]. Pestic Biochem Physiol, 1992, 42(1): 64-77.
- [10] LIU Yong-jie (刘永杰), SHEN Jin-liang (沈晋良). 甜菜夜蛾对四类杀虫剂的抗性监测 [J]. Cotton Sci (棉花学报), 2002, 14(6): 352-360.
- [11] LIU Yong-jie (刘永杰), SHEN Jin-liang (沈晋良). 甜菜夜蛾对高效氯氟氰菊酯抗性的表皮渗透机理 [J]. Acta Entomol Sinica (昆虫学报), 2003, 46(3): 288-291.
- [12] LIU Yong-jie (刘永杰), SHEN Jin-liang (沈晋良), ZHAO Xu-dong (赵旭东), et al. 多功能氧化酶系与甜菜夜蛾对高效氯氟氰菊酯抗药性的关系 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2005, 7(1): 19-23.
- [13] HE Yun-zhuan (何运转), LIM ei (李梅), FENG Guo-ke (冯国蕾), et al. 拟除虫菊酯对家蝇 Na-K-ATP 酶抑制作用的研究 [J]. Acta Entomol Sinica (昆虫学报), 1999, 42(1): 19-24.
- [14] FENG Bei-yuan (冯北元), XU Mu-yu (徐慕禹). 大鼠脑突触体 (Na-K) ATP 酶活力的微量测定方法 [J]. Dev Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展), 1981, 17(2): 48-49.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [16] Luo M, Bodnaryk R P. The effect of insecticides on Ca-Mg-ATPase and the ATP-dependent calcium pump in moth brain synaptosomes and synaptosome membrane vesicle from the bethel am yworm, *Mamestra configurata* [J]. Pestic Biochem Physiol, 1988, 30: 155-165.

(Ed. TANG J)