

· 研究论文 ·

多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾解毒酶系活力的影响

尹显慧^{1,2,3}, 吴青君^{*1}, 李学锋², 张友军¹, 徐宝云¹

(1 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2 中国农业大学 理学院, 北京 100094
3 贵州大学 农学院, 贵阳 550025)

摘要: 采用多杀菌素亚致死浓度, 以浸叶法分别处理小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 敏感种群 (SS) 和亚致死选育种群 [Sub-SS, 即用亚致死浓度 (LC_{25}) 连续处理 5 代后的种群] 的 3 龄幼虫, 分别测定饲喂处理 6、12、24、48 和 72 h 后小菜蛾体内羧酸酯酶 (CarE)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 和多功能氧化酶 (MFOs) 的活性, 分析了酶活性的变化动态。结果表明, SS 种群小菜蛾 CarE 的活性在不同时间段波动较大, 经多杀菌素处理后, 开始时段比活力增加, 随着处理时间的延长, 比活力逐渐被抑制, Sub-SS 种群的 CarE 活力高于 SS 种群; 多杀菌素对 GST 具有明显的诱导作用, 亚致死浓度处理后 GST 比活力呈上升趋势, 且具有一定的时间效应; 对细胞色素 P450 酶系的 O-脱甲基酶活性具有明显的抑制作用, 多杀菌素亚致死浓度连续处理 5 代后, 该酶活性更低。

关键词: 小菜蛾; 亚致死浓度; 多杀菌素; 解毒酶系

中图分类号: Q965.9 S481.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)01-0028-07

Effect of Sublethal Concentrations of Spinosad on the Activities of Detoxifying Enzymes in the Larvae of Diamondback Moth *Plutella xylostella*

YIN Xian-hui^{1,2,3}, WU Qing-jun^{*1}, LI Xue-feng², ZHANG You-jun¹, XU Bao-yun¹

(1 Department of Plant Protection, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2 College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

3 Agricultural College, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract The third instar larvae of two *Plutella xylostella* (L.) strains, one was susceptible to spinosad (SS strain) and the other was obtained by selecting the SS strain with LC_{25} spinosad for more than five generations (Sub-SS strain), were treated with LC_{25} or LC_{50} concentrations of spinosad using cabbage leaf dip method and then determined the activities of the detoxifying enzymes. After treated for 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h, activities of the carboxylesterase (CarE), the glutathione S-transferase (GST) and the mixed-function oxidases (MFOs) were investigated respectively. The results showed that the activities of the three enzymes changed with time and different treatments. The specific activity of CarE in SS strain fluctuated significantly both in the control and LC_{25} or LC_{50} treated groups. At the beginning of spinosad treatment, the specific activity of CarE increased but was inhibited gradually with the increase of treatment time. In general, the CarE activities of different treatment in Sub-SS strain were higher than those in SS strain. The GST activities were induced significantly by sublethal concentrations

收稿日期: 2007-11-03 修回日期: 2007-12-03

作者简介: 尹显慧 (1978-), 女, 博士研究生, E-mail: agrxhyi@gzu.edu.cn* 通讯作者 (Author for correspondence): 吴青君 (1971-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事蔬菜害虫毒理学及抗药性治理研究。联系电话: 010-68919518 E-mail: wuqj@mail.caas.net.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (“973”计划) 项目 (2006CB102003); 国家自然科学基金项目 (30171431); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD08A03-3)。

of spinosad and had an obvious time effect. However, the activities of O-demethylation of MFOs were distinctly inhibited by sublethal concentrations of spinosad. The activities of MFOs in the Sub-SS were lower than those in the SS strain.

Key words *Plutella xylostella*; sublethal concentration; spinosad; detoxifying enzymes

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 属鳞翅目 (Lepidoptera) 菜蛾科 (Plutellidae), 是十字花科蔬菜的主要害虫之一, 全球每年的防治费用高达 10 亿美元^[1], 目前仍以化学防治为主。杀虫剂施用于田间后, 除直接杀死大部分害虫外, 还对害虫及天敌存在着一定的亚致死效应, 包括害虫生物学和生态学行为的改变、生殖力的变化、抗药性的发展等^[2-5]。昆虫酶活性的表达受昆虫发育阶段、激素水平、种群、性别、食物种类及食物的质量和环境等多种因素的影响^[6]。近年来, 采用生化分析方法 (如解毒酶、保护酶、靶标酶活性测定) 研究杀虫剂的亚致死效应, 进而预测害虫的种群动态已经成为毒理学研究的重要内容^[7,8]。羧酸酯酶 (carboxylesterase, CarE)、谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GSTs)、多功能氧化酶系 (mixed-function oxidases, MFOs) 是昆虫体内重要的三大代谢酶和解毒酶, 在杀虫剂代谢、昆虫抗药性等方面都具有重要的作用^[9-11]。

多杀菌素 (spinosad) 是一类由 *Saccharopolyspora* 属放线菌刺糖多孢菌 *S. spinosa* 经有氧发酵分离获得的新颖大环内酯化合物, 能有效地控制鳞翅目、双翅目和缨翅目害虫, 对捕食性昆虫表现出较低的毒性^[12]。随着多杀菌素的商品化制剂——菜喜 (Success) 被广泛地用于防治小菜蛾等十字花科蔬菜害虫, 其抗药性问题也引起了人们的关注^[13]。但对于多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾相关代谢酶系、生长发育生理指标及其相互关系尚缺乏系统的研究报道。笔者在生化水平上对多杀菌素亚致死浓度处理后小菜蛾解毒酶系的活性变化进行了研究, 分析了酶活性的变化动态。

1 材料与方法

1.1 试虫及饲养

小菜蛾敏感种群 (SS): 由浙江大学应用昆虫学研究所惠赠, 饲养条件为: 25°C ± 1°C, RH 65%, 光周期 16 L: 8 D。幼虫用无虫甘蓝苗连续饲养, 成虫用 10% 蔗糖溶液补充营养。饲养期间未接触

任何杀虫剂。小菜蛾亚致死选育种群 (Sub-SS): 敏感种群 SS 用多杀菌素亚致死浓度 (LC₂₅) 连续处理 5 代后的种群, 饲养条件同上。

1.2 供试药剂和仪器

菜喜[®] (spinosad) 2.5% 悬浮剂 (美国陶氏益农公司); 曲拉通 (Triton X-100 京旭东化工厂)。乙酸 α-萘酯 (1-Naphthyl acetate, 化学纯)、固蓝 B 盐 (Fast Blue B)、98% 毒扁豆碱 (eserine) 和十二烷基硫酸钠 (SDS, 电泳级), 均为 Sigma 公司产品; 牛血清白蛋白组份五 (Roche 公司产品); 考马斯亮兰 G-250 (BBI 公司产品); 1-萘酚 (1-Naphthol), 分析纯 (国药集团化学试剂)。2,4-二硝基氯苯 (CDNB)、对硝基苯酚, 分析纯 (北京化学试剂公司); 99% EDTA (Amresco 公司); L-谷胱甘肽 (还原型), 纯度 > 99.5% (Rocha 公司)。NADPH 还原型辅酶 II (Rocha 公司产品); 二巯苏糖醇 (DTT) (Merck 公司产品); 苯硫脲 (PTU) (上海化学试剂公司产品) 苯甲基磺酰氟 (PM SF) (BBL 公司); 对硝基苯甲醚, 化学纯 (北京试剂厂)。

UV-2800 型紫外可见分光光度计 (上海尤尼柯仪器有限公司); Sigma 3K15 型冷冻离心机 (BMH Instruments Co. LTD, 德国)。

1.3 生物测定

参照 Zhao 等^[14] 的叶片药膜法。取新鲜无农药污染的甘蓝叶片, 清洗干净后浸于系列浓度药液中 10 s 以蒸馏水 (含体积分数为 0.05% 的 Triton X-100) 作对照。处理叶片于室温晾干后接大小一致的小菜蛾 3 龄幼虫 (2~3 mg/头), 每浓度 3 次重复, 每重复接 20 头幼虫, 然后置于恒温室内, 48 h 后调查结果。数据用 POLO 软件处理, 计算 LC₂₅、LC₅₀ 值及其 95% 置信区间等。

1.4 亚致死浓度处理

根据生物测定结果, 以两个种群各自 48 h 后的 LC₂₅ 和 LC₅₀ 值作为亚致死浓度, 以含体积分数为 0.05% Triton X-100 的蒸馏水为对照, 共 5 个处理。取新鲜无农药污染的甘蓝叶片, 在不同的亚致死浓度多杀菌素药液中浸 10 s 室温晾干, 分别置于塑料杯 (φ 7.0 cm × 7.0 cm) 中, 对应地接入大小一致已饥饿 4 h 的 SS 和 Sub-SS 的 3 龄幼虫

(2~3 mg/头), 每处理共 200~300 头幼虫, 分别饲喂 6、12、24、48 和 72 h 后取活虫制备酶液。

1.5 羧酸酯酶 (CarE) 活力测定

参照 Hama^[15] 方法, 取不同处理的幼虫 20 mg 加 pH 7.0 0.04 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS) 1 mL 匀浆 (冰浴), 在高速冷冻离心机上, 于 4℃、9 000 r/min 下离心 10 min, 上清液稀释 10 倍 (以 pH 7.0 浓度 0.04 mol/L 的 PBS 稀释) 作为工作酶液。

以 α -NA 为底物 (其中含毒扁豆碱 10^{-4} mol/L), 30℃ 水浴中反应 15 min 后加入 1 mL 显色液 (1% 固蓝 B 盐水溶液: 5% SDS 水溶液 = 2:5) 终止反应, 于 600 nm 下测定光密度值。每处理设 3 次重复。由 α -萘酚制作标准曲线。工作酶液经蛋白质测定, 得出蛋白质含量, 计算出 CarE 的比活力 [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot (30 \text{ min})^{-1}$]。

1.6 谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活性测定

参考 Oppenoort 等^[16] 和慕立义比色法^[17], 以 CDNB 为底物, 在酶催化下形成谷胱甘肽-S-芳基复合物, 在 340 nm 处出现最大吸收峰。取 20 mg 各处理小菜蛾幼虫, 加 1 mL 0.07 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液, 冰浴匀浆, 在 4℃ 下以 9 000 r/min 离心 60 min, 取上清液稀释到适当浓度作工作酶液。

在试管中分别加入 0.066 mol/L 的 PBS 2.4 mL、0.05 mol/L 的 GSH 0.3 mL、0.03 mol/L 的 CDNB 0.1 mL、工作酶液 0.2 mL, 立即混匀, 27℃ 下记录 340 nm 5 min 内的 OD 变化值。测定工作酶液蛋白质含量, 计算出 GSH 的比活力 ($\Delta \text{OD}_{340} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Pro}$)。

1.7 多功能氧化酶 (MFOs) 活力测定

参照 Yu 等^[18] 方法测定多功能氧化酶 O-脱甲

基活性: 以对硝基苯甲醚为底物, 在 MFOs 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。将 40 mg 处理后存活幼虫置于 1 mL 0.1 mol/L, pH = 7.8 的磷酸缓冲液 PBS (含 1 mmol/L 的 EDTA, 1 mmol/L 的 DTT, 1 mmol/L 的 PTU, 1 mmol/L 的 PM SF) 中, 冰浴下匀浆。在 4℃, 12 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液再次离心 30 min, 再取上清液 800 μL 用超纯水定容至 3 mL 作为测定酶液。反应体系为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的对硝基苯甲醚 1.5 mL, 9.6 mmol/L 的 NADPH 0.15 mL 和酶液 1.35 mL, 30℃ 下静置 30 min 后测定。工作酶液经蛋白质测定, 得出蛋白质含量。在 405 nm 下比色, 用对硝基苯酚的生成量表示酶活力 [$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Pro} \cdot (30 \text{ min})^{-1}$]。

1.8 蛋白质浓度测定

采用 Bradford 考马斯亮蓝 G-250 法^[19]。

1.9 统计分析

方差分析采用 SAS 软件 (Proc ANOVA; SAS Institute, 2000)。

2 结果与分析

2.1 多杀菌素对小菜蛾的毒力测定

表 1 显示了小菜蛾种群 SS 和 Sub-SS 种群的敏感性。可以看出, 两种群的 LC_{50} 值基本一致, 说明在 5 代内, 多杀菌素亚致死浓度下连续处理对小菜蛾敏感性无明显影响。进一步计算得到 SS 种群和 Sub-SS 种群在 48 h 的 LC_{25} 值分别为 0.261 和 0.231 mg/L, 以此作为亚致死浓度处理 3 龄幼虫。

表 1 敏感和亚致死种群小菜蛾 3 龄幼虫对多杀菌素的敏感性

Table 1 Susceptibility of the third instar larvae of susceptible and sublethal dose-selected *Plutellaxylostella* to spinosad

小菜蛾品系 Strains	斜率 Slope b value \pm SE	致死中量 LC_{50} /(mg/L)	95% 置信限 95% Confidence limit/(mg/L)	卡方 χ^2	LC_{25} /(mg/L)
SS	1.777 \pm 0.046	0.626	0.509~0.771	4.782	0.261
Sub-SS	1.491 \pm 0.052	0.654	0.515~0.830	3.569	0.231

注: SS, 敏感种群; Sub-SS, 亚致死浓度连续选育 5 代后的种群。

Note: SS, spinosad-susceptible strain. Sub-SS, sublethal spinosad selected SS strain for more than 5 generations.

2.2 亚致死浓度处理不同种群小菜蛾幼虫后 CarE 活性比较

多杀菌素亚致死浓度处理对小菜蛾的 CarE

比活力有一定的影响 (图 1, A)。SS 种群在 6~72 h 内比活力在 1.438~8.032 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot (30 \text{ min})^{-1}$ 范围内呈峰形波动, 处理 12 h

时比活力达到最大值。LC₂₅和 LC₅₀浓度处理开始阶段,比活力比对照有所增加; 12 h后, 药剂处理组比活力低于对照组; 24 h后处理和对照组的活力基本一致, 无差异; 随后, 处理组的比活力明显低于对照组, 差异显著。

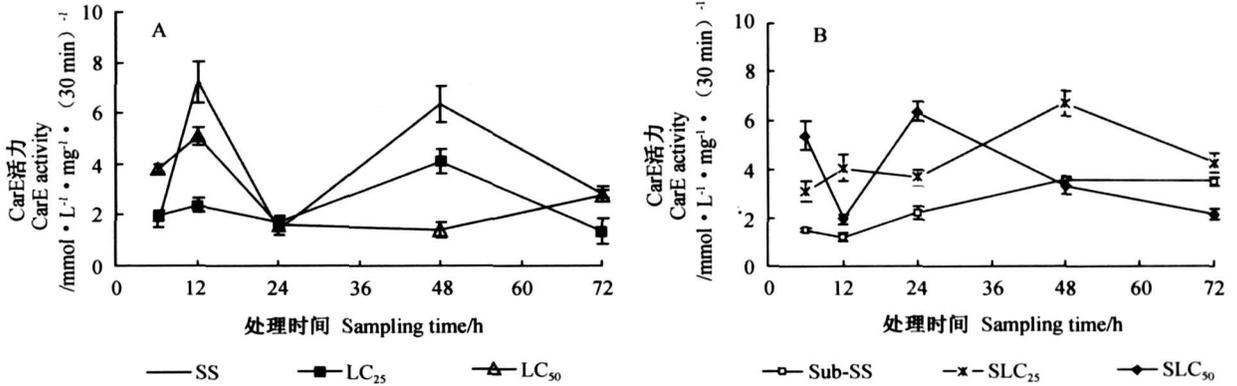


图 1 多杀菌素亚致死浓度作用下小菜蛾 CarE 的活力变化

Fig 1 Dynamics of carE activity in *P. xylostella* treated with sublethal concentration of spinosad

A: 敏感种群, B: 亚致死选育种群. A: SS strain B: Sub-SS strain

为了进一步说明多杀菌素代谢机制与羧酸酯酶的关系, 对 SS 与 Sub-SS 种群 CarE 的活力变化曲线进行了纵向比较。SS 种群小菜蛾从 3 龄幼虫开始 72 h 内 CarE 活力变化波动较大, 而连续处理 5 代后的 Sub-SS 种群 CarE 活力在 72 h 内变化不大, 尤其在 12 h、48 h SS 种群比 Sub-SS 种群 CarE 活力分别高 82.90% 和 44.37%, 经方差分析, 酶活性数据间的差异达到显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 水平。同时用多杀菌素 LC₂₅ 处理 Sub-SS 和 SS 后, 可以看出两种群变化趋势一致, 但是 Sub-SS 种群 CarE 活力高于 SS 种群, 说明连续采用多杀菌素处理小菜蛾 5 代后, CarE 的活力提高。总体来说, 小菜蛾本身 CarE 的活力变化波动较大, 且具有一定的时间效应。

2.3 亚致死浓度处理不同种群小菜蛾幼虫后 GST 活性比较

多杀菌素 LC₂₅、LC₅₀ 处理小菜蛾 SS、Sub-SS 种群后, GST 活性变化趋势总体上比对照组高 (图 2)。SS 种群 3 龄幼虫在 6~72 h 内, GST 活性变化不大, LC₂₅ 处理除 48 h 活性与对照组无差异外, 其他时间段的活性均比对照的高; LC₅₀ 处理在 24 h 后活性明显比对照组高, 经过方差分析, 酶活性数据间的差异达到显著 ($P < 0.05$) 或极显著

用亚致死浓度处理 Sub-SS 种群, 在 48 h 内, 处理组 SLC₂₅、SLC₅₀ 的 CarE 活力均比对照组 Sub-SS 的高; 在 48~72 h 对照组的 CarE 比活力比 SLC₅₀ 处理组的高, 但是显著低于 SLC₂₅ 处理组 (图 1, B)。

($P < 0.01$) 水平 (图 2, A)。

Sub-SS 种群的 GST 比活力在 12 h 内降低, 随后趋于平缓, 变化不大; SLC₂₅ 处理除在 12 h 内活力比对照低外, 12 h 后活力均比对照高; 而 SLC₅₀ 处理除在 24 h 与对照活性差异不明显外, 其余时间段均比对照要高 (图 2, B)。Sub-SS 种群的 GST 比活力在 6 h 时比 SS 高 1.68 倍, 达到极显著水平, 说明多杀菌素亚致死浓度连续处理对小菜蛾的 GST 有一定诱导作用; 12 h 后随着虫龄增加, SS 与 Sub-SS 种群比活力无明显差异, 而且均比其他处理组的低, 尤其是多杀菌素 LC₂₅、LC₅₀ 浓度处理小菜蛾 12 h 后, 其 GST 的比活力明显高于对照组。

2.4 亚致死浓度处理不同种群小菜蛾幼虫后 MFOs 活性比较

SS 种群的 O-脱甲基活力随时间变化的范围在 $1.350 \sim 2.405 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Pro} \cdot (30 \text{ min})^{-1}$ 之间, 经多杀菌素处理后, 除在 48 h 无差异外, 其他时间小菜蛾体内的 O-脱甲基活力明显低于对照组。对照组在 24 h 内活力上升, 随后降低, 48 h 后再次上升。LC₅₀ 浓度处理 24 h 后, 活性呈下降趋势, LC₂₅ 浓度处理 48 h 后, 比活力下降 (图 3, A)。

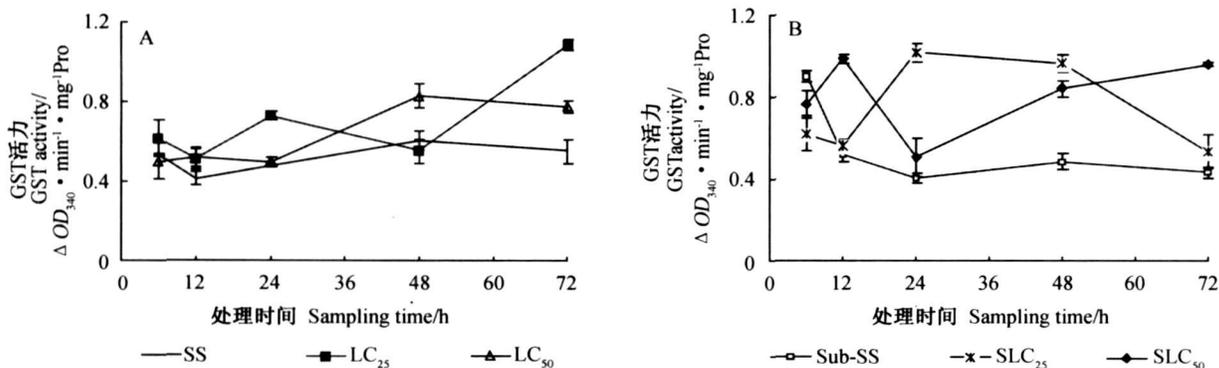


图2 多杀菌素亚致死浓度作用下小菜蛾 GST 的活力变化

Fig. 2 Dynamics of GST activity in *Plutella xylostella* treated with sublethal concentration of spinosad

A: 敏感种群, B: 亚致死选育种群. A: SS strain, B: Sub-SS strain

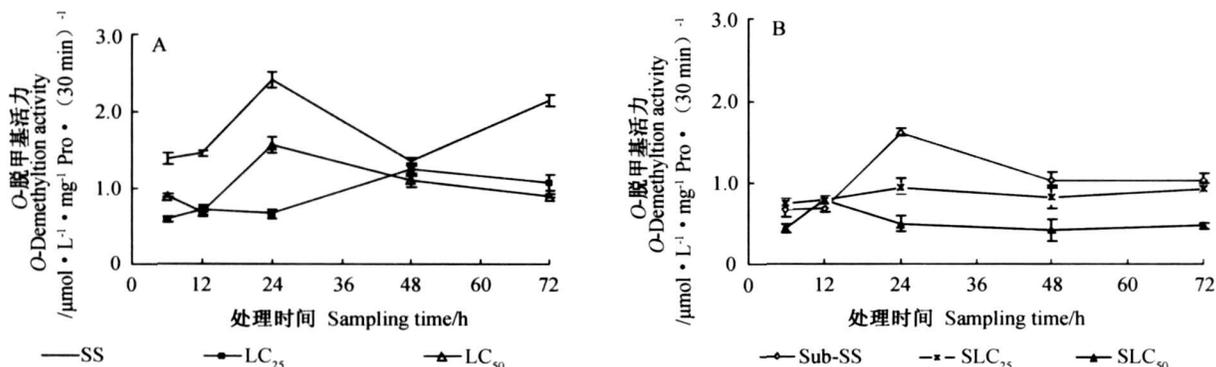


图3 多杀菌素亚致死浓度作用下小菜蛾 MFO O-脱甲基的活力变化

Fig. 3 Dynamics of Microsomal O-demethylation activity in *P. xylostella* treated with sublethal concentration of spinosad

A: 敏感种群, B: 亚致死选育种群. A: SS strain, B: Sub-SS strain

Sub-SS 种群再经多杀菌素处理, 在 12 h 时, SLC₂₅、SLC₅₀ 和 Sub-SS 对照三者的氧化酶 O-脱甲基活力无差异, 此后对照组的活性均比处理组的高, 尤其在 24 h 时, 对照组比其他两处理的活性分别高 41.16% 和 69.41%, 差异分别达到显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 水平 (图 3B)。

小菜蛾 SS 种群与 Sub-SS 种群的氧化酶 O-脱甲基活力变化趋势基本一致, 但前者的活性明显高于后者。另外, Sub-SS 与 LC₅₀ 处理的动力曲线基本重叠, 说明连续亚致死浓度 LC₂₅ 处理 5 代后的氧化酶 O-脱甲基活力与 LC₅₀ 处理敏感种群的 CK 相当。因此, 多杀菌素亚致死浓度处理能明显降低小菜蛾的氧化酶 O-脱甲基活力, 连续亚致死浓度处理 5 代后, 小菜蛾的 MFOs 活性更低。

3 讨论

昆虫解毒酶系的诱导作用是对内源和外源有

毒物质 (包括杀虫剂) 的一种适应^[20]。昆虫的解毒酶系活性能被各种外源化合物诱导, 这使昆虫在受到非常严重的化学环境压力作用下能迅速作出反应, 从而存活下来^[21]。因此, Rumpf 等提出酶比活力可以作为一种生物标记来测定杀虫剂的亚致死效应^[9]。

CarE 是昆虫体内的重要解毒酶系, 主要通过代谢体内某些内源及外来有害物质, 使其分解, 排出体外, 从而达到解毒的目的。张友军等报道多杀菌素在活体条件下能诱导虫体内的羧酸酯酶活性使之增强^[22]。夏冰等用阿维菌素与高效氯氟菊酯亚致死剂量处理阿维菌素敏感小菜蛾品系, CarE 活性均比对照显著升高^[23]。本研究发现小菜蛾不同处理在不同时间段 CarE 活性变动较大, 在处理 72 h 内, 有升高, 有抑制, 这在一定程度上说明 CarE 的作用可能不是小菜蛾幼虫分解多杀菌素毒害的主要因素。小菜蛾 CarE 活力对多

杀菌素不同亚致死浓度 LC_{25} 和 LC_{50} 处理不同时间的反应存在差异,可能是小菜蛾在不同程度胁迫下而采取的一种生存对策^[24]。

GST是对杀虫剂产生代谢抗性的重要酶系,参与许多分子的解毒机制。梁沛等用阿维菌素和高效氯氰菊酯的亚致死剂量处理小菜蛾后,敏感品系 GST 活性增长,而抗性品系的降低^[25]。魏波采用 4 种杀虫剂的 LC_{50} 剂量处理棉铃虫后 144 h 内,幼虫 GST 活性变化规律与对照有一定差异,昆虫在杀虫药剂刺激一段时间后,其 GST 处于动态的调整之中^[26]。在本研究中也发现,不同小菜蛾种群亚致死浓度处理后,在不同时间段其 GST 活性也有一定的波动,从总的趋势看,多杀菌素亚致死浓度处理组的 GST 活性均比对照组的高。尤其是 Sub-SS 种群再用药剂处理,处理组的 GST 明显高于对照组,差异显著。比如在 6 h 时, LC_{50} 处理后的 GST 活力比对照组高 1.68 倍。说明多杀菌素进入小菜蛾体内,导致 GST 的活性明显提高。但是 Mo 等曾报道甜菜夜蛾对多杀菌素抗性和敏感种群 3 龄幼虫的 GST 活性影响无差异^[27],说明多杀菌素对不同种类昆虫及昆虫不同发育龄期 GST 的活性影响是不同的。Bakaba-skaran 等^[28]对抗药性小菜蛾幼虫 GST 的研究也表明,小菜蛾各个发育阶段都存在 GST,幼虫期的 GST 随发育不断增高,蛹期达到最高峰,在成虫期下降。

MFO 的底物广泛,能够参与各种类型杀虫剂的解毒作用,其中 O-脱甲基酶作用是多功能氧化酶代谢杀虫剂的重要途径之一^[29]。韦存虚等研究发现辛硫磷能抑制棉铃虫 MFOs 催化的环氧化酶和 O-脱甲基酶,结果导致对氰戊菊酯的代谢减慢^[30]。魏辉等研究了多杀菌素亚致死浓度 LC_{20} 、 LC_{50} 处理小菜蛾后 36 h 内的 MFO 活力变化动态,发现酶活力随时间变化趋势与对照相似,但低于对照^[31]。本研究中,在 36 h 内小菜蛾体内的 O-脱甲基活力变化动态与上述研究结果基本一致,多杀菌素亚致死浓度处理后 6、12、24 和 36 h,小菜蛾体内 MFOs 的活性发生明显变化,并具有时间效应。由于多杀菌素是能有效控制多种害虫的新型生物源杀虫剂,持效期长,因此本文还研究了处理后 72 h MFOs 活性的变化。经多杀菌素处理后,明显地抑制了小菜蛾的 MFOs 活性,除在 48 h 无差异外,其他时间小菜蛾体内的 O-脱甲基活力明显低于对照组,差异显著。同时连续用 LC_{25} 浓度处理,5 代后的氧化酶 O-脱甲基活力也明显低于

对照。有不少报道证实杀虫剂作用于昆虫后,会明显地抑制体内的 MFOs 活性,从而影响昆虫的氧化代谢,如马志卿等研究发现脱氧鬼臼毒素能显著抑制粘虫的 MFOs 活性^[32],王娟等也报道了印楝素能抑制小菜蛾体内 O-脱甲基酶的活力^[33]。本研究也得到一致的结果,说明多杀菌素作为一种外源物,进入昆虫体内后抑制了 MFOs 的活性,导致昆虫对其难以代谢,同时也抑制了昆虫的正常代谢,在亚致死浓度下不易产生抗药性,这与咪唑抑制蜜蜂的微粒体氧化酶系活性从而提高了对蜜蜂的毒性结果相似^[34]。

多杀菌素处理后对小菜蛾的正常生长发育具有明显的抑制、延缓作用,本研究中酶活测定采用的是动力学法,这使不同时间所测样品的结果具有可比性,从而能更加全面地评价多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾幼虫的酶活影响。总之,杀虫剂亚致死效应及其机制的研究是害虫可持续治理中一项重要的较为复杂的课题,探讨杀虫药剂亚致死效应的生物化学和分子生物学机制,对于合理使用杀虫剂,减少其副作用及协调生防与化防的关系,都具有积极的意义。

参考文献:

- [1] TALEKAR N S, SHELTON A M. Biology, Ecology and Management of the Diamondback Moth [J]. *Annu Rev Entomol* 1993, 38: 275-301.
- [2] PERVEEN F. Sublethal Effects of Chlorfluazuron on Reproductivity and Viability of *Spodoptera litura* (F.) (Lep., Noctuidae) [J]. *J Appl Entomol* 2000, 124: 5-6, 223-231.
- [3] ELZEN G W. Lethal and Sublethal Effects of Insecticide Residues on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthrenidae) and *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) [J]. *J Econ Entomol* 2001, 94(1): 55-59.
- [4] GAO Zong-ren (高宗仁), LI Qiao-si (李巧丝), LU Xiaochun (刘孝纯). 杀虫剂对朱砂叶螨某些生物学特性的影响 [J]. *Acta Phytophyl Sin* (植物保护学报), 1991, 18(3): 283-287.
- [5] NANDHALLI B S, PATIL B V, HUGAR P. Influence of Synthetic Pyrethroid Usage on Aphid Resurgence in Cotton [J]. *Karnataka Agric Sci* 1992, 5(3): 234-237.
- [6] DEVORSHAK C, REOR M. The Role of Esterases in Insecticide Resistance [J]. *Rev Toxicol* 1998, (2): 501-537.
- [7] DESNEUX N, DECOURTYE A, DELFUECH J M. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods [J]. *Annu Rev Entomol* 2007, 52: 81-106.
- [8] HYNE R V, MAHER W A. Invertebrate Biomarkers: Links to Toxicosis that Predict Population Decline [J]. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003, 54: 366-374.
- [9] RUMPF S, HETZEL E, FRAMPTON C. Laccases

- (Neuroptera: Hemerobiidae and Chrysopidae) and Integrated Pest Management Enzyme Activity as Biomarker of Sublethal Insecticide Exposure [J]. *J Econ Entomol*, 1997, 90 (1): 102-108.
- [10] GAO Xi-wu (高希武), DONG Xiang-li (董向丽), ZHENG Bing-zong (郑炳宗), et al 棉铃虫的谷胱甘肽 S-转移酶 (GST): 杀虫剂和植物次生性物质的诱导与 GST 对杀虫剂的代谢 [J]. *Acta Entomologica Sinica (昆虫学报)*, 1997, 40(2): 122-125.
- [11] FEYEREISEN R. Cytochrome P450 in Insect [M] // SCKENKMAN J.B. Cytochrome P450. Berlin: Springer, 1993: 311-324
- [12] GERALD B. WATSON G B. Action of Insecticidal Spinosyns on Gamabutyric Acid Responses from Smalldiameter Cockroach Neurons [J]. *Pestic Biochem Physiol* 2001, 71: 20-26
- [13] WANG Yan-hua (王彦华), WANG Ming-hua (王鸣华). 多杀菌素的作用机理及其抗药性的研究进展 [J]. *Pestic Sci Adm (农药科学与管理)*, 2006 25(11): 12-15.
- [14] ZHAO J Z, LI Y X, COLLINS H L, et al Monitoring and Characterization of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) Resistance to Spinosad [J]. *J Econ Entomol*, 2002, 95: 430-436
- [15] HAMA H, HOSODA A. High Aesterase Activity and Low Acetylcholinesterase Sensitivity Involved in Organophosphorus and Carbamate Resistance of the Brown Planthopper [J]. *Appl Entomol Zool*, 1983, 18(4): 475-485
- [16] OPPENOORT H F J VAN DER PAS L JR, HOUX N W H. Glutathione-S-transferase and Hydrolytic Activity in a Tetrachlorophos-resistance Strain of Housefly and their Influence on Resistance [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1979, 11: 176-188
- [17] MU Li-yi (慕立义). Research Methods of Chemical Plant Protection (植物化学保护研究方法) [M]. Beijing (北京): China Agriculture Press (中国农业出版社), 1994 160-161
- [18] YU S J, NGUYEN S N. Detection and Biochemical Characterization of Insecticide Resistance in the Diamondback Moth [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1992, 44 (1): 74-81.
- [19] BRADFORD W W. A Rapid and Sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilization the Principle of Protein-dye Binding [J]. *Anal Biochem*, 1976 72: 248-254
- [20] TANG Zhen-hua (唐振华), BI Qiang (毕强). The Molecular Behavior of Pesticides (杀虫剂作用的分子行为) [M]. Shanghai (上海): Shanghai Yundong Press (上海远东出版社), 2003: 58-110.
- [21] TANG Zhen-hua (唐振华). Insecticide Resistance of Insects and its Management (昆虫抗药性及其治理) [M]. Beijing (北京): China Agriculture Press (中国农业出版社), 1993: 212-245
- [22] ZHANG You-jun (张友军), WANG Guang-feng (王光峰), WU Qing-jun (吴青君), et al 多杀菌素对甜菜夜蛾多酚氧化酶和羧酸酯酶的影响 [J]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)*, 2003, 5(2): 40-46
- [23] XIA Bing (夏冰), SHI Tai (石泰), LIANG Pei (梁沛), et al 杀虫剂亚致死剂量对小菜蛾羧酸酯酶的影响 [J]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)*, 2002 4(1): 23-27.
- [24] CHEN Lie-zhong (陈列忠), WANG Kai-jin (王开金), YU Xiao-ping (俞晓平), et al 雷公藤生物碱对小菜蛾幼虫生长及其解毒酶系的影响 [J]. *Entomol J East China (华东昆虫学报)*, 2005, 14(3): 238-242
- [25] LIANG Pei (梁沛), XIA Bing (夏冰), GAO Xi-wu (高希武), et al 阿维菌素和高效氯氰菊酯亚致死剂量对小菜蛾谷胱甘肽 S-转移酶的影响 [J]. *J Chin Agric Univ (中国农业大学学报)*, 2003, 8(3): 65-68
- [26] WEI Bo (魏波), HAO Chi (郝赤), LI Hu-xian (李会仙). 杀虫剂亚致死剂量对棉铃虫靶标酶的影响 [J]. *Modern Pesticides (现代农药)*, 2006, 5(3): 35-38.
- [27] MO J C, WANG W, CHENG J A, et al Selection and Characterization of Spinosad Resistance in *Spodoptera exigua* (Hbner) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2006, 84 180-187.
- [28] BALABASKARAN S, CHUEN S S, MUNIANDY S. Glutathione-S-transferase from the Diamondback Moth *Plutella xylostella* (L.) [J]. *Insect Biochem*, 1989, 19 (4): 435-443
- [29] LENG Xin-fu (冷欣夫), TANG Zhen-hua (唐振华), WANG Yin-chang (王荫长). Molecular Toxicology and Insect Insecticide Resistance (杀虫剂分子毒理学及昆虫抗药性) [M]. Beijing (北京): China Agriculture Press (中国农业出版社), 1996 134.
- [30] WEI Cun-xu (韦存虚), ZHU Fu-xing (朱福兴), LI Dong-xia (李东霞), et al 氰戊菊酯、辛硫磷及其混剂对棉铃虫解毒代谢酶的影响 [J]. *J Yangzhou Univ (扬州大学学报)*, 2004, 25 (3): 59-64.
- [31] WEI Hui (魏辉), LI Hong-shan (李洪山), DAI Hua-guo (戴华国), et al 多杀菌素对小菜蛾体内多功能氧化酶和保幼激素酯酶活力的影响 [J]. *Chin J Pestic Sci (农药学报)*, 2006 8(3): 239-244
- [32] MA Zhong-qing (马志卿), LI Guang-ze (李广泽), ZHANG Xing (张兴), et al 脱氧鬼臼毒素对粘虫几种代谢酶系的影响 [J]. *Acta Entomologica Sinica (昆虫学报)*, 2007, 50 (2): 186-190.
- [33] WANG Juan (王娟), DAI Hua-guo (戴华国), LI Hong-shan (李洪山). 印楝素作用下小菜蛾体内 MFO 和 HE 活力的变化 [J]. *Acta Agric Jiangxi (江西农业学报)*, 2006, 18 (4): 121-125.
- [34] PILLING E D, BROMLEY CHALLENGER K A C, WALKER C H, et al Mechanism of Synergism between the Pyrethroid Insecticide lambda-Cyhalothrin and the Imidazole Fungicide Prochloraz in the Honeybee (*Apis mellifera* L.) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1995 51: 1-11.

(Ed JIN SH)