

· 研究简报 ·

# 不同生境的草间钻头蛛种群对拟除虫菊酯类杀虫剂的敏感性及其体内解毒酶活性的测定

张征田<sup>1,2</sup>, 彭宇<sup>\*1</sup>, 刘凤想<sup>1</sup>

(1. 湖北大学 生命科学学院, 武汉 430062; 2. 南阳师范学院 生命科学系, 河南 南阳 473061)

**摘要:** 采用浸渍法测定了不同生境的草间钻头蛛 *Hylyphantes grammicola* 种群对氰戊菊酯、溴氰菊酯和氯氰菊酯的敏感性, 并对其体内的酯酶、多功能氧化酶-O-脱甲基和谷胱甘肽-S-转移酶的活性进行了测定。结果表明, 不同生境的草间钻头蛛种群对 3 种拟除虫菊酯杀虫剂的敏感水平不同: 草丛种群最为敏感; 棉田种群的抗药性最强, 其中对氰戊菊酯的抗药性最高, 相对抗性指数为 14.61, 达到中抗水平; 其他种群对 3 种杀虫剂较敏感或抗性较低。5 种生境草间钻头蛛体内的酯酶、多功能氧化酶-O-脱甲基和谷胱甘肽-S-转移酶的活性均以草丛种群最低, 棉田种群最高。酯酶和多功能氧化酶-O-脱甲基活性的增强可能是棉田草间钻头蛛种群对拟除虫菊酯类杀虫剂不敏感或产生抗性的原因。

**关键词:** 草间钻头蛛; 杀虫剂; 敏感性; 解毒酶

中图分类号: S481.4

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)01-0084-04

## Measurement on Susceptibility to Pyrethroids and Detoxified Enzymes Activities of *Hylyphantes grammicola* from Different Habitats

ZHANG Zheng-tian<sup>1,2</sup>, PENG Yu<sup>\*1</sup>, LIU Feng-xiang<sup>1</sup>

(1. Faculty of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China;

2. Department of Life Sciences, Nanyang Normal College, Nanyang 473061, Henan Province, China)

**Abstract** The susceptibility of five populations of *Hylyphantes grammicola* collected from different habitats in Wuhan, China to fenvalerate, deltamethrin and fenvalerate were investigated by dipping methods. The results showed that *H. grammicola* from different habitats had different sensitivity level to pyrethroids. *H. grammicola* from grass field was the most sensitive population to the 3 pyrethroids, and that from cotton field developed middle level of resistance to fenvalerate and the relative resistant index was 14.61. Biochemical study showed that the activities of esterase, MFO-O-demethylation and GST of the grass field population were the lowest while the activities of esterase and MFO-O-demethylation of the cotton field population were the highest. It was suggested that the resistance of *H. grammicola* to pyrethroids may be related to the increased activities of esterase and MFO-O-demethylation.

**Key words** *Hylyphantes grammicola*; habitats; susceptibility; detoxified enzymes

收稿日期: 2006-09-20 修回日期: 2006-11-15

作者简介: 张征田 (1978-), 男, 湖北红安人, 硕士, 讲师, 主要从事动物学研究, E-mail: zzt0105@yahoo.com.cn \* 通讯作者: 彭宇 (1967-), 男, 湖北江陵人, 博士, 教授, 主要从事害虫生物防治研究, 联系电话: 027-50865609, E-mail: pengyu@hubu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 39900097, 30270895).

化学杀虫剂的广泛应用虽然在害虫防治中取得了很好的效果,但给蜘蛛等害虫天敌带来的危害也是有目共睹的<sup>[1,2]</sup>。如何使蜘蛛等天敌免受农药的伤害、更好地发挥其在害虫生物防治中的作用,是摆在植保工作者面前迫切需要解决的问题。有研究表明,抗药性蜘蛛品系的培育及田间释放可能是解决这些问题的有效途径之一<sup>[3]</sup>,但目前尚未见有关抗药性蜘蛛培育的研究报道。为了较好地汰选和培育抗药性蜘蛛品系,作者曾测定了不同地区的草间钻头蛛 *Hyalophantes grammicola* 种群对常见杀虫剂的敏感水平(另文发表)。本文报道采自湖北武汉 5 种不同作物生境的草间钻头蛛种群对 3 种拟除虫菊酯类杀虫剂的敏感水平,以及对蜘蛛体内 3 种解毒酶活性的测定结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试蜘蛛及饲养

供试草间钻头蛛 *H. grammicola* 种群分别采自武汉中国农业科学院油料作物研究所油菜田、湖北大学沙湖杂草地、华中农业大学的水稻田、玉米田及武汉市东西湖农场的棉田。将采回的蜘蛛单头饲养于玻璃指管(长 13 cm,直径 2 cm)中,管底部放置吸足水的海绵,以供蜘蛛饮水。将指管放于恒温培养箱内(温度 25℃,光照 14 h),饲喂果蝇 *Drosophila* sp 和摇蚊 *Tendipes* sp 成虫,4 d 后,去除幼蛛和雄蛛,选雌性草间钻头蛛成蛛用于杀虫剂敏感性和酶活性的测定。

### 1.2 供试药剂及试剂

有效成分质量分数为 2.5% 的溴氰菊酯(deltamethrin)乳油[艾格福(天津)有限公司];20% 的氰戊菊酯(fenvalerate)乳油(江苏激素研究所实验一厂);4.5% 的氯氰菊酯(cypermethrin)乳油(南京第一农药厂)。乙酸- $\alpha$ -萘酯、 $\alpha$ -萘酚和甘氨酸(均为上海试剂一厂生产);十二烷基磺酸钠(沈阳化学试剂一厂);坚固蓝 RR 盐、三羟甲基氨基甲烷、四甲基乙二胺、5,5'-二硫双对硝基苯甲酸(DTNB)、对硝基苯甲醚(CDNB)、还原型谷胱甘肽(GSH)和牛血清白蛋白(均为 Sigma 公司生产);考马斯亮蓝 G-250、溴酚蓝、辅酶 II(NADPH)(均为武汉亚法生物技术有限公司进口分装)。

### 1.3 蜘蛛对杀虫剂的敏感性测定

采用浸渍法<sup>[4,5]</sup>。将供试杀虫剂按梯度稀释配成 5~6 个浓度,将供试蜘蛛浸渍于各浓度药液的玻璃指管中。每浓度处理蜘蛛 30 头,每头浸渍 10 s。浸后将蜘蛛放在吸水纸上吸去多余的杀虫剂,放入培养皿(直径 5 cm,高 1.2 cm)中,以吸足水的海绵保湿,不喂食,48 h 后检查蜘蛛的死亡率。按照 Finney 几率值分析法<sup>[6]</sup>求回归方程、 $LC_{50}$ 值、95% 置信限和  $\chi^2$  等。

### 1.4 酯酶活性测定

参照 Van Asperen<sup>[7]</sup>方法。将 10~25 头蜘蛛匀浆后于 4 000 r/min 下离心 15 min,取上清液并稀释适当倍数后作为酶液。所有操作均在 4℃ 下进行。酶活力测定:在试管内加入 5 mL 底物,置于 25℃ 下平衡 5 min,加入酶液 1 mL,摇匀,置于 25℃ 下温育 30 min,立刻加入 1 mL DTNB 显色液,0.5 h 后测定 600 nm 的 OD 值。对照以 1 mL 缓冲液代替酶液。

### 1.5 多功能氧化酶(MFO)-O-脱甲基活性测定

参照 Hansen 和 Hodgson<sup>[8]</sup>的方法并加以改进。10~25 头蜘蛛用 0.2 mol/L pH 值为 7.8 的磷酸缓冲液冰浴匀浆,匀浆液于 0℃ 12 000 r/min 下离心 15 min,取上清液为酶源。反应体系含 1 mL 酶液、2.5 mg NADPH、10  $\mu$ L 0.1 mol/L 的 CDNB 和 2 mL 磷酸缓冲液,于 34℃ 恒温水浴中振摇 30 min,加入 1 mL 1 mol/L 的盐酸终止反应。用 5 mL 氯仿萃取,取氯仿层 3 mL 与 3 mL 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液混合,测定 400 nm 下 OD 值。

### 1.6 谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的活性测定

参考 Habig<sup>[9]</sup>的方法。取不同生境的蜘蛛 10~25 头,在 1 mL 磷酸缓冲液(浓度 0.2 mol/L, pH 7.8)中冰浴匀浆,于 6 000 r/min 下冷冻离心 10 min,取上清液作为酶源。在由 30 mmol/L GSH 和 30 mmol/L CDNB 各 0.03 mL、酶液 0.03 mL 和 0.81 mL 磷酸缓冲液组成的反应体系中测定酶活。

### 1.7 蛋白质含量的测定

参照 Bradford<sup>[10]</sup>的方法,用考马斯亮蓝 G-250 测定各酶液中蛋白质含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 供试蜘蛛对拟除虫菊酯类杀虫剂的敏感性

来自 5 个生境的草间钻头蛛对 3 种杀虫剂的

敏感性不同,其中,以草丛种群对溴氰菊酯最为敏感。以其为相对敏感种群,计算了各种群对3种杀虫剂的相对抗性指数(见表1、表2和表3)。结果表明:棉田种群对溴氰菊酯的耐药性最强,其相对抗性指数为4.23,属低抗水平。对氰戊菊酯的敏感性也以草丛种群最高,玉米田种群和稻田种

群也很敏感;而棉田种群对氰戊菊酯的相对抗性指数最高,为14.61,达到中抗水平;油菜田种群对氰戊菊酯的抗性也接近中抗水平,相对抗性指数为9.41。对氯氰菊酯也以草丛种群最为敏感,棉田种群耐药性最强,其相对抗性倍数为8.38,接近中抗水平。

Table 1 Susceptibility of *H. graminicola* collected from different habitats to deltamethrin

Collecting areas	LD-p line	LC <sub>50</sub> (95% CL) / (mg/L)	$\chi^2$	Relative resistance index*
Grass field	$Y = 3.56 + 2.54x$	3.68 (2.82~4.81)	2.65	1.00
Com field	$Y = 3.53 + 1.73x$	7.08 (4.95~10.13)	0.22	1.92
Vegetable field	$Y = 4.55 + 1.45x$	9.81 (6.20~16.18)	0.03	2.66
Rice field	$Y = 2.79 + 1.95x$	14.57 (9.48~19.42)	0.34	3.95
Cotton field	$Y = 3.71 + 1.98x$	15.60 (12.78~20.59)	0.08	4.23

\* Relative resistance index was the ratio of LC<sub>50</sub> value of *H. graminicola* from different habitats to that from grass field. The same as in the following tables

Table 2 Susceptibility of *H. graminicola* collected from different habitats to fenvalerate

Collecting areas	LD-p line	LC <sub>50</sub> (95% CL) / (mg/L)	$\chi^2$	Relative resistance index
Grass field	$Y = 2.26 + 2.26x$	16.30 (12.18~21.82)	0.92	1.00
Com field	$Y = 2.56 + 1.92x$	18.55 (13.24~26.01)	1.47	1.14
Rice field	$Y = 2.54 + 1.54x$	39.42 (19.79~78.54)	0.36	2.41
Vegetable field	$Y = 1.54 + 1.58x$	153.5 (59.30~397.1)	0.11	9.41
Cotton field	$Y = 1.34 + 1.57x$	238.2 (160.2~353.0)	0.44	14.61

Table 3 Susceptibility of *H. graminicola* collected from different habitats to cypemethrin

Collecting areas	LD-p line	LC <sub>50</sub> (95% CL) / (mg/L)	$\chi^2$	Relative resistance index
Grass field	$Y = 4.63 + 1.02x$	2.30 (0.48~11.05)	0.14	1.00
Com field	$Y = 3.56 + 2.54x$	3.68 (2.82~4.81)	2.65	1.60
Vegetable field	$Y = 3.25 + 1.18x$	9.27 (6.55~13.13)	2.29	4.03
Rice field	$Y = 2.66 + 2.05x$	13.80 (10.07~18.92)	0.53	6.85
Cotton field	$Y = 2.22 + 2.17x$	19.28 (13.49~27.56)	0.22	8.38

## 2.2 供试蜘蛛的酯酶活性

测定结果表明,草丛种群酯酶活性最低;棉田种群活性最高,其活性为草丛种群的2.34倍;其他种群酯酶活性虽然比草丛种群高,但差异不显著(见表4)。结合敏感性的测定结果,认为棉田草间钻头蛛种群对拟除虫菊酯类杀虫剂不敏感或者产生了中等水平的抗药性,可能与其体内酯酶活性的增强有关。

## 2.3 MFO-O-脱甲基活性

MFO是一种氧化酶系,能将多种进入昆虫体内的外源物质进行氧化、代谢和解毒,使昆虫对杀虫剂的敏感性降低<sup>[4]</sup>。本研究表明,不同生境草间钻头蛛种群的MFO-O-脱甲基活性也以草丛种

群最低,棉田种群最高,棉田种群的活性为草丛种群的2.96倍,差异达到显著水平(表4)。可见草间钻头蛛对除虫菊酯类杀虫剂变得不敏感或者产生抗药性,可能与其体内的MFO-O-脱甲基活性增强有关。但与昆虫相比,草间钻头蛛体内的MFO-O-脱甲基活性较低,这也可能是拟除虫菊酯类杀虫剂对草间钻头蛛毒力很强的原因之一<sup>[5]</sup>。

## 2.4 GST的活性

GST是一类多功能的解毒酶,在昆虫对有机磷及拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢中有重要作用<sup>[4]</sup>。本研究结果表明,不同生境草间钻头蛛种群的GST活性也有一定的差异,但种群之间的差异未达到显著水平(表4)。

Table 4 Esterase MFO and GST activities of *H. graminicola* collected from different habitats

Collecting areas	Activities of esterase / (OD / m in* mg)	Ratio*	Activities of MFO -O-demethylation / (μmol/m in* mg)	Ratio*	Activities of GST / (μmol/m in* mg)	Ratio*
Grass field	0.053 a	1.00	1.23 ± 0.09 a	1.00	16.13 ± 0.60 a	1.00
Com field	0.069 a	1.17	1.54 ± 0.12 a	1.25	19.32 ± 0.15 a	1.20
Vegetable field	0.078 a	1.23	1.45 ± 0.04 a	1.18	18.22 ± 0.37 a	1.12
Rice field	0.083 a	1.31	1.37 ± 0.35 a	1.11	17.31 ± 0.20 a	1.07
Cotton field	0.138 b	2.34	3.64 ± 0.61 b	2.96	22.29 ± 0.61 a	1.38

\* Indicated the ratios of enzymes activities of *H. graminicola* from different habitats to that from grass field. Data in the table followed by different letters had significant difference (P < 0.05).

### 3 讨论

有关不同生境对动物的形态<sup>[11]</sup>、生理特征<sup>[12]</sup>、分布<sup>[13]</sup>及捕食<sup>[14]</sup>等方面的影响均有报道,而关于生境对动物耐药性影响的报道很少,钱薇萍等<sup>[15]</sup>测定了4种不同生境的致乏库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 幼虫对右旋丙烯菊酯、右旋丙炔菊酯及其混配制剂(有效成份 1:1)的敏感性,结果表明,这两种杀虫剂及其混配制剂对供试幼虫的 LC<sub>50</sub> 值接近。而本文的研究结果与之不同,不同生境的草间钻头蛛种群对3种拟除虫菊酯类杀虫剂的敏感水平存在一定差异,以棉田种群的耐药性或抗药性最高。

我国棉田施用拟除虫菊酯类杀虫剂已有多年,1985年前棉铃虫对该类药剂一直保持敏感,但由于长期单一、大量和无限限制的施用,至20世纪80年代后期开始出现抗药性。至今棉铃虫对溴氰菊酯和氰戊菊酯的抗性发展经历了敏感、敏感性降低、低水平抗性、中等水平抗性和高水平抗性5个阶段<sup>[16]</sup>。长期施用某类杀虫剂,不仅会使害虫产生抗药性,也使害虫的天敌产生一定的耐药性或抗药性。本研究中均以棉田蜘蛛种群对3种拟除虫菊酯类杀虫剂的耐药性或抗药性最高,这与棉田长期施用拟除虫菊酯类杀虫剂有关。但与棉铃虫相比,棉田蜘蛛的抗药性水平依旧很低,抗性发展很缓慢。

### 参考文献:

[1] PAN Wei-qun(潘威群), HU Guo-wen(胡国文). 杀虫双水剂对食虫瘤蜘蛛和拟水狼蛛的影响 [J]. *Chin J Biol Control* (中国生物防治), 1995, 11(3): 125-128  
 [2] DONG C-xiang(董慈祥). 八种农药对两种蜘蛛的毒性 [J]. *Natural Enemies of Insects* (昆虫天敌), 1994, 6(3): 134-135.  
 [3] PENG Yu(彭宇), HAN Zhao-jun(韩召军), WANG Yin-chang(王荫长). 蜘蛛对农药敏感性的测定方法 [J]. *Chin J*

*Zool* (动物学杂志), 2001, 36(3): 47-49.  
 [4] TANG Zhen-hua(唐振华). The Insecticide Resistance and Control(昆虫抗药性及其治理) [M]. Beijing (北京): Agriculture Press(农业出版社), 1993  
 [5] PENG Yu(彭宇), HAN Zhao-jun(韩召军), WANG Yin-chang(王荫长). 四种杀虫剂对草间钻头蛛和三突花蛛的毒力测定 [J]. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 2000, 23(4): 117-119  
 [6] FINNEY D. J. *Probit Analysis* [M]. London: Cambridge Univ Press, 1971.  
 [7] Van ASPEREN K. A Study of Housefly Esterase by Means of a Sensitive Colorimetric Method [J]. *Insect Physiol*, 1962, 8: 401-416.  
 [8] HANSEN L. G., HODGSON E. Biochemical Characteristics of Insect Microsomes N- and O-Demethylation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1971, 20: 1569-1578  
 [9] HABIG W. H. Assays for Differentiation of Glutathione-S-Transferase [M] / W. ILLIAM B. J. *Methods of Enzymology*. New York: Academic Press, 1981: 398-405  
 [10] BRADFORD M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantities of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding [J]. *Analytical Biochem*, 1976, 72: 248-254  
 [11] SHU Feng-yue(舒凤月), OUYANG Shan(欧阳珊). 不同生境蚰形无齿蚌的形态观察 [J]. *Sichuan J Zool* (四川动物), 2004, 23(4): 322-324.  
 [12] LIU Yan-hua(刘艳华), CHEN Meng(陈萌), LI Xing-ping(李兴平). 不同生境黑线姬鼠消化道长度和重量的比较 [J]. *J Nanjing Forestry Univ: Nat Sci Ed* (南京林业大学学报: 自然科学版), 2004, 28(2): 90-92  
 [13] YANG Yu-wu(杨玉武), ZHANG Qim-ing(张启明). 不同生境源异色瓢虫对蚜虫选择趋性研究 [J]. *China Plant Protection* (中国植保导刊), 2006, 26(1): 5-7  
 [14] SUN Xiao-ling(孙晓玲), REN Bing-zhong(任炳忠), ZHAO Zhuo(赵卓), et al. 东北地区不同生境内蝗虫区系的比较 [J]. *Chin J Ecol* (生态学杂志), 2006, 25(3): 286-289  
 [15] QIAN Wei-ping(钱薇萍), CHEN Dong-ping(陈东平), ZHOU Yi-zhao(周忆昭), et al. 不同生境致乏库蚊幼虫对2种杀虫剂及其混配制剂的敏感性 [J]. *Chin J Vector Biol and Control* (中国媒介生物学及控制杂志), 1998, 9(3): 173.  
 [16] ZENG Xian-ying(曾献英), LÜ Shuang-jun(吕双俊). 棉铃虫的抗药性及其治理 [J]. *Chin Cotton* (中国棉花), 2004, (3): 44.

(Ed JN SH)