

溴氰虫酰胺胁迫对小地老虎保护酶和解毒酶活性的诱导效应

何发林^{1,2}, 姜兴印^{1,2*}, 尚佃龙^{1,2}, 姚晨涛^{1,2},
谭海丽^{1,2}, 李向东¹, 张吉旺³

(1. 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018; 2. 山东省农药毒理与应用技术重点实验室, 泰安 271018; 3. 山东农业大学农学院, 泰安 271018)

摘要 为明确小地老虎对溴氰虫酰胺的代谢解毒机制, 采用浸叶法测定了溴氰虫酰胺对小地老虎 3 龄幼虫室内毒力, 在此基础上, 通过酶动力学法检测了溴氰虫酰胺亚致死剂量对小地老虎保护酶和解毒酶活力的影响, 并比较了不同剂量处理后 1、6、12、24、48 和 72 h 时小地老虎体内保护酶和解毒酶活力的动态变化。结果表明, 溴氰虫酰胺亚致死剂量初期可诱导过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活力升高; 对羧酸酯酶(CarE)活力表现为早期诱导、后期抑制的作用; 对谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)活力表现为明显的诱导作用; 对多功能氧化酶(MFOs)表现为一定程度的抑制作用。研究结果为深入了解小地老虎对溴氰虫酰胺的防御机理提供了一定的理论基础。

关键词 溴氰虫酰胺; 小地老虎; 毒力; 解毒酶; 保护酶

中图分类号: S 481.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018284

Induction of the protective and detoxification enzymes by cyantraniliprole in *Agrotis ipsilon*

HE Falin^{1,2}, JIANG Xingyin^{1,2}, SHANG Dianlong^{1,2}, YAO Chentao^{1,2},
TAN Haili^{1,2}, LI Xiangdong¹, ZHANG Jiawang³

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;
2. Shandong Provincial Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Tai'an 271018, China;
3. College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract In order to clarify the mechanisms of metabolism and detoxification of *Agrotis ipsilon* after exposure to sublethal dose of cyantraniliprole, the leaf dipping method was used to determine the toxicity of cyantraniliprole against the 3rd-instar larvae of *A. ipsilon* in the laboratory. The effects of sublethal dose of cyantraniliprole on the activity of protective enzymes and detoxification enzymes in *A. ipsilon* were detected by enzyme kinetic method, and the dynamic changes of the enzyme activities were compared at 1, 6, 12, 24, 48 and 72 h, respectively. The results showed that the activities of peroxidase (POD), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) were increased after exposed to sublethal doses of cyantraniliprole at the early stage of treatments, and the activity of carboxyl esterase (CarE) was induced at the early stage and inhibited at the later stage; the activity of glutathione S-transferase (GSTs) was significantly induced, and the activity of mixed function oxidase was, to some extent, inhibited after exposed to sublethal concentrations of cyantraniliprole. The results provide the theoretical basis for further understanding the defense mechanisms of *A. ipsilon* against cyantraniliprole.

Key words cyantraniliprole; *Agrotis ipsilon*; toxicity; detoxifying enzymes; protective enzymes

收稿日期: 2018-07-04 修订日期: 2018-09-11

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0200604); 山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-02-10); 山东“双一流”奖补项目(SYL2017-XTTD11); 山东省农业重大应用技术创新项目

* 通信作者 E-mail: xyjiang@sdau.edu.cn

小地老虎 *Agrotis ipsilon* (Rottemberg) 属鳞翅目夜蛾科,是地老虎中分布最广,为害最严重的一种地下害虫^[1],在中国各地均有分布,食性杂,可为害多种农作物及苗木的幼苗和根部^[2],常造成农作物缺苗、断垄,对其产量造成严重威胁。由于全球气候变暖和农业种植制度的改变,小地老虎的生存环境有了很大的变化,近年来该虫在中国发生为害日趋严重^[3]。小地老虎在不同年份对药剂的敏感性不同^[4],加上取食量大、分布不均匀,给防治带来很大的难度。长期以来,对该害虫的防治主要以化学防治为主。研究表明小地老虎已对有机磷类、菊酯类等多种药剂产生了很高的抗性,有些种类的杀虫剂对其甚至完全失效^[4-7]。

昆虫的生理生化抗性在其对杀虫剂抗药性的产生和发展过程中起着主要作用^[8],可通过诱导或抑制其体内保护酶活力的变化来阻止外界毒物侵害的影响,以增强其耐药性和抗逆性^[9]。另外,昆虫解毒代谢能力的增强也是其产生抗药性的主要机理之一^[10]。杀虫剂在田间施用后,随着应用时间的延长,药剂会被逐渐降解至亚致死剂量,该剂量低不足以杀死昆虫,但仍可引起害虫生态学、抗药性、生殖力、生育历期、药剂代谢能力等发生改变,即产生亚致死效应,进而引起害虫的再猖獗^[11-12]。

关于防治小地老虎的药剂,国内外均有很多研究报道^[13-18]。溴氰虫酰胺是 DuPont 公司继氯虫苯甲酰胺之后成功开发的第二代鱼尼丁受体抑制剂类杀虫剂,可有效防治大部分鳞翅目害虫^[19]。研究表明,与其他种类药剂相比,溴氰虫酰胺具有毒力更高、选择性强和击倒速度快等特点^[20-21],目前,国内外尚未有溴氰虫酰胺亚致死剂量对小地老虎体内保护酶和解毒酶活性影响的相关报道。本研究采用酶动力学法测定 LC_{10} 、 LC_{25} 及 LC_{40} 剂量的溴氰虫酰胺对小地老虎幼虫体内保护酶和解毒酶在 1、6、12、24、48 和 72 h 的动态变化,以深入了解小地老虎对溴氰虫酰胺的防御机理,以期应用溴氰虫酰胺科学合理地防治小地老虎提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及饲养

将玉米田中诱集到的小地老虎成虫饲以 20% 的蜂蜜水,在室内条件下饲养至产卵。1~2 龄幼虫喂食洁净甘蓝叶片,3 龄以后转入 12 孔细胞培养

板,并喂食新鲜的人工饲料,老熟幼虫转入平底试管内饲养直至化蛹。试验之前在室内条件下纯化驯养几代后再使用,以消除环境的影响。试虫饲养条件:人工智能养虫室,温度为 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 $75\% \pm 5\%$ 、光周期为 $L/D=16\text{ h}/8\text{ h}$ 、光照强度 $3\ 500\text{ lx}$ 。选择大小一致的新蜕皮(12 h 内)3 龄幼虫作为试虫。

1.2 供试药剂与仪器

94% 溴氰虫酰胺原药(美国杜邦公司);EDTA、DTT、对硝基苯甲醚、 α -苯基硫脲(PTU)、 α -苯基磺酰氟(PMSF)、1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、还原型谷胱甘肽(GSH)、固蓝 B 盐、 α -乙酸萘酯(α -NA)和谷胱甘肽还原酶, Sigma 公司;考马斯亮蓝 G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250), BBI 公司;牛血清白蛋白(Albumin Fraction V), Roche 公司; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、丙酮($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$)、天津大茂化学试剂厂; TritonX-100, 北京雅安达生物技术有限公司;十二烷基硫酸钠 SDS、愈创木酚、过氧化氢(H_2O_2)、核黄素、甲硫氨酸、85% 磷酸等其他试剂均为国产分析纯。

紫外分光光度计 Epoch2, 美国伯腾公司;超低温冰箱 MDF-U4086S, 日本三洋; pH 计 PHSJ-4A, 上海精密科学仪器有限公司;低温离心机 Centrifuge 5408R, 德国 Eppendorf 公司;RXZ 智能型人工气候箱, 宁波江南仪器厂; -80°C Thermo 超低温冰箱, 赛默飞世尔科技公司。

1.3 试验方法

1.3.1 溴氰虫酰胺对小地老虎 3 龄幼虫的毒力测定

采用浸叶法测定溴氰虫酰胺对小地老虎 3 龄幼虫的毒力,在预试验的基础上,将溴氰虫酰胺原药用丙酮配制成 $1 \times 10^4\text{ mg/L}$ 母液,再用 0.05% 的 TritonX-100 水溶液按照等比的方法将药剂稀释至试验浓度。用直径 1.5 cm 打孔器将洁净甘蓝 *Brassica oleracea* 打成小叶碟(避免主叶脉),各处理分别在药液中浸渍 10 s,取出后晾干(25°C , 2 h),然后放入 24 孔细胞培养板(孔径 16 mm, 孔深 17 mm)中,每孔放 3 片叶碟,每孔接入 1 头新蜕皮(12 h 内)3 龄试虫,每个处理重复 4 次,每个重复 24 头试虫,以 0.05% 的 TritonX-100 水溶液作对照。于 24、48 及 72 h 后检查死亡虫数,用毛笔轻触无反应者视为死亡。

1.3.2 酶源制备

根据室内毒力测定结果,选择 LC_{10} 、 LC_{25} 、 LC_{40} 三个亚致死剂量研究溴氰虫酰胺对小地老虎保护酶与解毒酶活力的影响,以含 0.05% 的 TritonX-100 水溶液作为对照,共 4 个处理,生物测定方法同 1.3.1。分别于处理后 1、6、12、24、48 和 72 h 选取生长状况整齐一致的存活幼虫,用灭菌去离子水清洗,并用液氮冷冻后保存于 -80°C 冰箱中备用。

酶液制备:取处理后试虫 1 头,置于预冷的 5 mL 玻璃匀浆器中,加入 1.5 mL 0.1 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液 (1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PTU, 1 mmol/L PMSF) 中,冰浴研磨,将提取液转入 2 mL 的离心管中,于 15 000 r/min, 4°C 冷冻离心 20 min,吸取上清液于 15 000 r/min, 4°C 离心 20 min,再次吸取上清液于 15 000 r/min, 4°C 离心 20 min,最终取上清液作为酶源备用,用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液将酶源稀释 10 倍作为待测酶液。每个亚致死剂量设 12 个生物重复,每个生物重复进行 4 次技术重复,酶源制备时所有的操作均在冰浴条件下进行。

1.3.3 保护酶活性测定

1.3.3.1 过氧化物酶(peroxidase, POD)活力测定

参照 Simon 等的方法进行^[22],在 96 孔酶标板中依次加入 20 μL 稀释酶液,再加入 200 μL 反应液 (现配现用,含 0.05 mol/L 愈创木酚、2% H_2O_2 、0.05 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液),混匀后用 Epoch2 紫外分光光度计进行检测,在波长为 470 nm 处测定其吸光值,每 30 s 记录数据,反应 10 min。测定酶液中蛋白质含量,酶活力以 $\Delta\text{OD}_{470}/(\text{min}\cdot\text{mg pro})$ 表示。

1.3.3.2 过氧化氢酶(catalase, CAT)活力测定

参照冯宏祖等方法进行^[23],用蒸馏水将 H_2O_2 配制成 8% 工作液,在 96 孔酶标板中依次加入 120 μL 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液和 60 μL 8% H_2O_2 ,再加入 20 μL 稀释酶液,用 Epoch2 紫外分光光度计进行检测,在 25°C 下进行酶促反应,在波长 240 nm 处测定其吸光值,每 30 s 记录数据,反应 10 min。CAT 活力单位定义为每毫克组织蛋白每秒分解的酶量为一个活力单位。

1.3.3.3 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力测定

参照张金锋等的方法进行^[24],略改进,提前配制反应液 (含有 10 $\mu\text{mol/L}$ EDTA、77 $\mu\text{mol/L}$ NBT、

15.6 mmol/L 甲硫氨酸、0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液、80 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素),在 96 孔酶标板中依次加入 200 μL 反应液和 20 μL 稀释酶液。置于 25°C 、4 000 lx 光下反应 15 min,黑暗法停止反应,用 Epoch2 紫外分光光度计进行检测,在波长 560 nm 处测定吸光值,以未光照的为对照, SOD 活力单位定义为以达到 50% 抑制率所需的酶量为 1 个活力单位。

1.3.4 解毒酶活性测定

1.3.4.1 羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)活力测定

参照贾变桃等^[9]和 Hama 等的方法^[25],以 α -乙酸萘酯(α -NA)为底物 (其中含毒扁豆碱 1×10^4 mol/L) 测定酯酶的活力,显色液为 1% 固蓝 B 盐水和 5% SDS 水溶液按照体积比为 2:5 配制而成 (即用即配)。在 96 孔酶标板中依次加入 150 μL 1 mmol/L α -乙酸萘酯和 50 μL 稀释酶液。在 30°C 条件下水浴反应 15 min,加入 20 μL 显色液混合液,在室温下静置 10 min。用 Epoch2 紫外分光光度计进行检测,光密度值在 600 nm 处测定 OD_{600} ,在 27°C 下进行酶促反应,每隔 20 s 记录一次,反应 20 min。计算 CarE 活力 ($\Delta\text{mOD}_{600}/(\text{min}\cdot\text{mg pro})$)。

1.3.4.2 谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)活力测定

参照 Oppenorth 等^[26]的方法并略有改动。用无水乙醇将 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)配成 120 mmol/L 母液,用 0.1 mol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液将母液稀释到 1.2 mmol/L 的底物溶液。然后在 96 孔酶标板中依次加入 10 μL 稀释酶液、100 μL 1.2 mmol CDNB 和 100 μL 6 mmol 还原型谷胱甘肽(GSH,用 0.1 mol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液现配现用)。用 Epoch2 紫外分光光度计进行检测,在波长 340 nm 处测定吸光值,在 30°C 下进行酶促反应,每隔 15 s 记录一次,反应 15 min。计算 GST 活力 ($\Delta\text{mOD}_{340}/(\text{min}\cdot\text{mg pro})$)。

1.3.4.3 多功能氧化酶(mixed function oxidase, MFOs)活力测定

参照田雪莲等^[27]和 Yu 等^[28]的方法,用无水乙醇将对硝基苯甲醚配制成 400 mmol/L 母液,再用事先预热的 0.1 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液将母液稀释到 2 $\mu\text{mol/L}$ 。在 96 孔酶标板中依次加入 100 μL 2 $\mu\text{mol/L}$ 对硝基苯甲醚和 90 μL 稀释酶液,

37℃温育 5 min,加入 10 μL 9.6 mmol/L NADPH。用 Epoch2 紫外分光光度计进行检测,在 405 nm 处测定吸光值,在 30℃下进行酶促反应,每 30 s 记录数据,反应 15 min。计算 MFOs 活力($\Delta\text{mOD}_{405}/(\text{min}\cdot\text{mg pro})$)。

1.3.5 蛋白质含量测定

蛋白质含量测定参照 Bradford 等^[29]考马斯亮蓝 G-250 方法进行。

1.4 数据分析

经 Excel 整理后,采用 SPSS 19.0 软件计算毒力回归方程、致死中浓度、卡方(χ^2)等以及对不同处

理酶活力数据进行方差分析,应用 Duncan 氏新复极差法比较不同亚致死剂量处理后不同时间内解毒酶及保护酶活力在 5%水平上的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 溴氰虫酰胺对小地老虎 3 龄幼虫的毒力

由表 1 可以看出,溴氰虫酰胺处理 24、48、72 h 后对小地老虎 3 龄幼虫的 LC_{50} 值分别为 0.940 3、0.477 6、0.298 3 mg/L, LC_{90} 值分别为 8.961 5、4.259 8、2.333 3 mg/L,结果表明溴氰虫酰胺对小地老虎具有很高杀虫活性、见效速度快。

表 1 溴氰虫酰胺对小地老虎 3 龄幼虫的毒力

药剂 Insecticide	处理时间/h Treatment time	毒力回归方程 Toxicity equation	$\text{LC}_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	95%置信限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Confidence interval	$\text{LC}_{90}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	95%置信限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Confidence interval	相关系数 Correlation coefficient
溴氰虫酰胺 cyantranilprole	24	$y=1.308\ 9x+4.345\ 5$	0.940 3	0.852 9~1.036 7	8.961 5	7.058 8~11.377 0	0.996 2
	48	$y=1.348\ 5x+5.432\ 8$	0.477 6	0.384 0~0.594 0	4.259 8	3.121 4~5.813 5	0.987 9
	72	$y=1.434\ 7x+5.753\ 6$	0.298 3	0.211 1~0.421 5	2.333 3	1.750 0~3.111 0	0.981 3

2.2 溴氰虫酰胺对小地老虎体内保护酶活性的影响

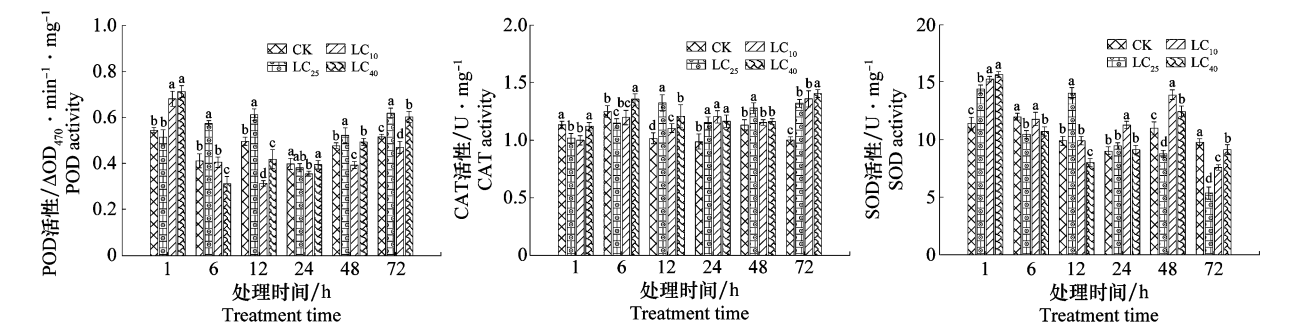
2.2.1 POD 活性

由图 1 可以看出,空白对照的 POD 活性只有在 24 h 时才高于溴氰虫酰胺各亚致死剂量处理,而其他时间段均低于溴氰虫酰胺处理。 LC_{10} 剂量处理的 POD 活性除了在 1 h 和 24 h 时低于空白对照的 POD 活性外,其他时间段均高于空白对照; LC_{25} 剂量处理的 POD 活性只有在 1 h 时显著高于空白对照的 POD 活性,其他时间段均低于空白对照; LC_{40} 剂量处理后在 1、48、72 h 时 POD 活性高于空白对照,而在 6、12、24 h 却低于空白对照。各亚致死浓

度处理后的 POD 活力没有随着浓度的增加而存在线性关系,总体为 LC_{10} 和 LC_{40} 剂量处理表现促进作用,而 LC_{25} 剂量处理表现为抑制作用。

2.2.2 CAT 活性

由图 1 可以看出,在处理后 1 h 和 6 h 时,空白对照的 CAT 活性高于 LC_{10} 和 LC_{25} 剂量处理;而随着时间的延长,空白对照的 CAT 活性均低于溴氰虫酰胺处理。溴氰虫酰胺处理后总体表现为先抑制后诱导的作用规律,表明随着处理时间的延长,亚致死剂量的溴氰虫酰胺对小地老虎体内的 POD 活力有一定的诱导作用。



图中数据为平均值±标准误。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。下同
Data are means ± SD. Bars labeled with the different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$). The same below

图 1 溴氰虫酰胺亚致死剂量作用下小地老虎 3 龄幼虫体内保护酶的活力变化
Fig. 1 Dynamics of protective enzyme activities in 3rd-instar larvae of *Agrotis ipsilon* treated with different sublethal doses of cyantranilprole

2.2.3 SOD 活性

由图 1 可以看出,亚致死剂量的溴氰虫酰胺处理后 1 h 和 24 h 时 SOD 活性明显高于空白对照,而在 6 h 和 72 h 时却显著低于空白对照的 SOD 活性,且各处理之间不都存在显著性。处理 1 h 的 SOD 活性与溴氰虫酰胺浓度呈正比例关系,浓度越高,激活作用越强;而在 72 h 的 SOD 活性与溴氰虫酰胺浓度呈负相关关系,浓度越低,抑制效果越明显。三个亚致死浓度的溴氰虫酰胺对 SOD 活力影响趋势相同,均表现为诱导→抑制→诱导→抑制的作用,表明溴氰虫酰胺处理后小地老虎体内 SOD 活力处于动态的调整之中。

2.3 溴氰虫酰胺对小地老虎体内解毒酶活性影响

2.3.1 CarE 活性

由图 2 可以看出,经溴氰虫酰胺 LC_{10} 、 LC_{25} 和 LC_{40} 剂量处理后对小地老虎体内 CarE 活性有一定的影响。在处理 0~24 h 内,三个亚致死浓度处理能显著提高小地老虎体内 CarE 活性,且随着溴氰虫酰胺亚致死浓度的升高酶活力促进效果越明显,表现为激活作用,其中 LC_{40} 剂量处理的促进效果最显著。在处理 24~72 h,空白对照 CarE 活性开始不断

提高,而药剂处理 CarE 活性开始下降,表现为抑制作用,各亚致死浓度处理能显著抑制其体内 CarE 活性。总体来说,经亚致死剂量的溴氰虫酰胺处理后,小地老虎体内 CarE 活性变化具有一定的时间效应,前期表现为诱导作用,随着处理时间的延长又表现为抑制作用。

2.3.2 GSTs 活性

由图 2 可以看出,经 LC_{10} 、 LC_{25} 和 LC_{40} 剂量的溴氰虫酰胺处理后,能显著提高小地老虎体内谷胱甘肽 S-转移酶活力,表明亚致死剂量的溴氰虫酰胺对 GSTs 活性具有明显的激活作用。在处理 1 h 和 72 h 时, LC_{10} 剂量的 GSTs 活性明显高于 LC_{25} 和 LC_{40} 剂量的 GSTs 活性;在处理 6 h 和 24 h 时, LC_{25} 剂量的 GSTs 活性显著高于 LC_{10} 和 LC_{40} 剂量的 GSTs 活性,在处理 12 h 和 48 h 时, LC_{40} 剂量的 GSTs 活性显著高于 LC_{10} 和 LC_{25} 剂量的 GSTs 活性。总体来说,经亚致死浓度的溴氰虫酰胺处理后, GSTs 活力曲线变化趋势呈波浪线分布,且剂量越低,体内 GSTs 应激反应越迅速,表明小地老虎体内的 GSTs 能动态调整其活力以抵御外源不良胁迫的影响。

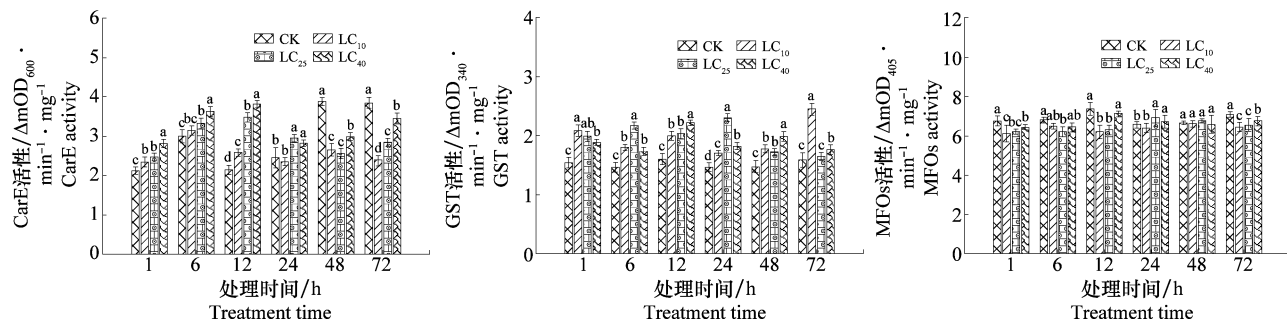


图 2 溴氰虫酰胺亚致死剂量作用下小地老虎 3 龄幼虫体内解毒酶的活力变化

Fig. 2 Dynamics of detoxifying enzymes activities in 3rd-instar larvae of *Agrotis ipsilon* treated with different sublethal doses of cyantraniliprole

2.3.3 MFOs 活性

由图 2 可以看出,亚致死剂量的溴氰虫酰胺处理 0~12 h 内能显著抑制 MFOs 活性,在处理 72 h 时也能明显抑制 MFOs 活性。空白对照的 MFOs 活力在 0~12 h 呈上升的趋势,并在 12 h 时达到最大值,在此时间段内空白对照的 MFOs 活性显著高于大部分亚致死剂量处理;在 72 h 时也明显高于各处理的 MFOs 活性。 LC_{10} 剂量处理在 0~6 h 内呈上升趋势; LC_{25} 剂量处理在 0~24 h 内呈上升趋势,并在 24 h 达到最大值, LC_{40} 剂量处理在 0~12 h 内呈

上升趋势,在 12 h 达到最大值。亚致死浓度的溴氰虫酰胺在处理 1、12 h 以及 72 h 时,其体内 MFOs 活力随着浓度提高明显升高,表现为诱导作用;其他时间段内各浓度处理间的 MFOs 活力无明显差异。表明亚致死剂量的溴氰虫酰胺对小地老虎体内 MFOs 活力表现为一定程度的抑制作用。

3 结论与讨论

溴氰虫酰胺与其他双酰胺类药剂相比最大差异在于其毒力更高、杀虫范围更广以及选择性更强

等^[30],该药剂不仅可以高效防治大部分鳞翅目害虫,而且对部分半翅目、鞘翅目害虫也具有较好的防治效果^[31-32],其亚致死效应、作用机制以及抗药性备受研究者的关注。杀虫剂亚致死剂量处理对昆虫生长发育、繁殖、新陈代谢及抗性等均有相应程度的影响^[33]。研究表明亚致死剂量的溴氰虫酰胺对小地老虎的生长发育、繁殖、能量物质以及营养指标均有显著的抑制作用^[34]。昆虫体内存在的解毒酶和保护酶在杀虫剂代谢和抗(耐)药性等方面也起着非常重要的作用^[33]。本研究通过酶动力学法检测了亚致死剂量的溴氰虫酰胺对小地老虎体内保护酶和解毒酶活力的动态变化,表明溴氰虫酰胺可诱导或抑制小地老虎体内保护酶和解毒酶活性,以提高虫体对溴氰虫酰胺的解毒代谢能力。

不同环境条件、寄主植物、化学药剂等选择压力对昆虫生长发育都表现出不同的影响^[35],当昆虫受到外源逆境胁迫(温度、湿度、CO₂ 浓度、化学药剂、寄主植物等)时,其体内的活性酶会迅速做出应激反应,从而存活下来^[9]。小地老虎取食不同种寄主植物对其幼虫成活率和生长发育都存在影响,幼虫体内 CAT 活性没有显著差异,而取食大豆 POD 和 SOD 活性高于取食白菜和玉米^[35]。外源逆境胁迫会使靶标昆虫产生应激反应,并在短时间内诱导保护酶活性升高,但后期保护酶活性逐渐下降,导致昆虫神经传导的异常反应而使昆虫死亡^[36];同时昆虫也通过调节体内的解毒酶活性来抵御外源逆境胁迫毒害^[37]。解毒酶和保护酶活性与靶标昆虫的种类有密切关系,而且不同寄主植物对靶标昆虫的存活率及解毒酶和保护酶活性影响都存在差异^[38],因此,不同逆境胁迫对昆虫体内的解毒酶和保护酶影响不同。

昆虫体内酶代谢能力增强所导致的抗药性是昆虫对杀虫药剂产生抗性的重要机制之一^[39],其中靶标酶(CarE、Na⁺ + K⁺ + ATP 酶)的敏感性降低、解毒酶(MFO、GSTs 和 EST)的活性增强以及保护酶(SOD、POD 和 CAT)的活力提高或变化是导致昆虫产生抗药性的主要原因之一^[40]。Na⁺ + K⁺ + ATP 酶是有机磷类和拟除虫菊酯类等药剂的靶标酶^[41],用 LC₅₀ 剂量的高效氯氰菊酯、辛硫磷处理棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 3 龄幼虫后,与空白对照相比,48 h 前 Na⁺ + K⁺ + ATP 靶标酶活力呈下降趋势,48 h 后其活力有开始回升的趋势,表明在外界毒物的刺激下,Na⁺ + K⁺ + ATP 靶标酶处于动态的调整之中^[42]。昆虫体内保护酶系的主要

作用是清除体内的活性氧或过氧化物自由基,一旦遭到破坏,将对细胞功能产生伤害作用,导致生活力下降,甚至引起死亡^[43]。廖月枝等报道了不同龄期舞毒蛾幼虫经甲氧虫酰胺处理后体内 POD、SOD 表现出相似的先上升后下降变化规律,该药剂对幼虫体内 POD 有显著的抑制作用,对几丁质酶也有一定影响^[44]。许多研究表明杀虫剂处理后通过干扰害虫体内正常的生理代谢而起到毒杀的作用^[45-46]。亚致死剂量的杀虫剂可诱导昆虫体内解毒酶活性升高,从而提高靶标昆虫对杀虫剂的解毒代谢能力^[43]。齐浩亮等的研究表明,氯虫苯甲酰胺和溴虫氟苯双酰胺处理后均能诱导小菜蛾体内 CarE 活力升高,而溴虫氟苯双酰胺对 MFOs 和谷 GSTs 活力没有显著影响^[47]。而余慧灵等发现亚致死剂量的溴氰虫酰胺对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 幼虫体内解毒酶活性有不同程度的抑制作用^[48]。不同药剂由于作用方式和机理的不同也会导致酶活力的差异,同时,不同种类、同一种类甚至同一杀虫剂对不同种类靶标害虫体内的保护酶、解毒酶活力影响均有差异。

杀虫剂亚致死效应及其机制与作用机理的研究是害虫可持续防治中一项重要的较为复杂的课题^[30],而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^[49]。溴氰虫酰胺不但对小地老虎毒力高^[20-21],而且对小地老虎的正常生长发育也具有明显的延缓或抑制作用^[34]。本研究采用动力学法测定了不同亚致死剂量的溴氰虫酰胺对小地老虎 3 龄幼虫不同时间段内解毒酶和保护酶活力的变化,在相同条件下,既可以比较不同剂量在相同时间的酶活力差异,也可以比较在不同时间相同剂量的酶活力变化,可全面地评价溴氰虫酰胺亚致死剂量对小地老虎幼虫体内解毒酶和保护酶活力的影响。研究结果为深入了解小地老虎对溴氰虫酰胺的防御机制提供一定的理论基础,关于其亚致死效应机制及作用机理,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] COSSENTINE J E. The experimental evolution on application microspodia against *Agrotis ipsilon* (Rottemberg) [J]. Entomophaga, 1987, 31(4): 323 - 330.
- [2] 向玉勇,杨茂发. 小地老虎在我国的发生危害及防治技术研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(33): 14636 - 14639.
- [3] 向玉勇,杨茂发,李子忠. 小地老虎室内连续饲养 12 代的化蛹率、羽化率和性比观察[J]. 黄山学院学报, 2010, 12(5): 67 - 69.

- [4] 李国清,王荫长.小地老虎的抗药性及几种增效剂增效作用的研究[J].农药,1995(10):19-22.
- [5] 徐春梅.溴氧虫酰胺种子处理防治玉米田小地老虎[D].泰安:山东农业大学,2017.
- [6] 杨建全,张玉珍.几种杀虫剂对小地老虎的毒力测定[J].生物安全学报,2000(1):53-56.
- [7] 于伟丽,杜军辉,胡廷萍,等.六种杀虫剂对小地老虎的毒力及对土壤生物安全性评价[J].植物保护学报,2012,39(3):277-282.
- [8] 尹飞,陈焕瑜,冯夏,等.乙基多杀菌素抗性小菜蛾代谢解毒酶活性研究[J].应用昆虫学报,2016,53(2):314-319.
- [9] 贾变桃,焦鹏,杨素梅.虱螨脲亚致死浓度对小菜蛾保护酶系和解毒酶系活力的影响[J].植物保护学报,2016,43(2):293-299.
- [10] 刘喃喃,朱芳,徐强,等.昆虫抗药性机理:行为和生理改变及解毒代谢增强[J].昆虫学报,2006,49(4):671-679.
- [11] RAKOTONDRAVELO M L, ANDERSON T D, CHARLTON R E, et al. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae)[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2006, 51(3): 360-366.
- [12] VOJOU DI S, SABER M, HEJAZI M J, et al. Toxicity of chlorpyrifos, spinosad and abamectin on cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and their sublethal effects on fecundity and longevity [J]. Bulletin of Insectology, 2011, 64(2): 189-193.
- [13] RINGS R W, ARNOLD F J, KEASTER A J, et al. A world-wide, annotated bibliography of the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) [M]. Ohio: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1974: 1-106.
- [14] 陈国生.六索线虫防治小地老虎的小区试验[J].中国生物防治学报,1989,5(3):125-126.
- [15] 李永禧.小地老虎生活习性及其防治[J].昆虫知识,1964(1):3-7.
- [16] 武海斌,范昆,张坤鹏,等.13种杀虫剂对小地老虎卵和幼虫的生物活性[J].环境昆虫学报,2013,35(3):409-414.
- [17] 韩召军.小地老虎对几类杀虫剂的毒力反应及其抗药性变化[J].植物保护学报,1986(2):125-130.
- [18] SALAMA H S. Strengthen control result of Bt. against *Agrotis ipsilon* (Rotttemberg) [J]. Journal of Applied Entomology, 1989, 108(4): 372-380.
- [19] 杨桂秋,黄琦,陈霖,等.新型杀虫剂溴氧虫酰胺研究概述[J].世界农药,2012,34(6):19-21.
- [20] 杜军辉,于伟丽,王猛,等.三种双酰胺类杀虫剂对小地老虎和蚯蚓的选择毒性[J].植物保护学报,2013,40(3):266-272.
- [21] 王猛,王凯,刘峰,等.溴氧虫酰胺和氯虫苯甲酰胺对三种鳞翅目害虫的毒力作用比较[J].植物保护学报,2014,41(3):360-366.
- [22] SIMON L M, FATRAI Z, JONAS D E, et al. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris* [J]. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 1974, 166(5/6): 387-392.
- [23] 冯宏祖,刘映红,何林,等.阿维菌素和温度胁迫对朱砂叶螨自由基及保护酶活性的影响[J].植物保护学报,2008,35(6):530-536.
- [24] 张金锋,薛庆中.稻飞虱为害胁迫对水稻植株内主要保护酶活性的影响[J].中国农业科学,2004,37(10):1487-1491.
- [25] HAMA H, HOSODA A. High aliesterase activity and low acetylcholinesterase sensitivity involved in organophosphorus and carbamate resistance of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae) [J]. Applied Entomology and Zoology, 1983, 18(4): 475-485.
- [26] OPPENOORTH F J, PAS L J T V D, HOUX N W H. Glutathion-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1979, 11(1): 176-188.
- [27] 田雪莲,尹显慧,龙友华,等.低剂量乙基多杀菌素对小菜蛾解毒酶的影响[J].农药学学报,2016,18(5):589-595.
- [28] YU S J, NGUYEN S N. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1992, 44(1): 74-81.
- [29] BRADFORD M M. 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(1/2): 248-254.
- [30] 郑雪松,赖添财,时立波,等.双酰胺类杀虫剂应用现状[J].农药,2012,51(8):554-557.
- [31] 胡译文,孙建昌,耿阳阳,等.溴氧虫酰胺研究进展及应用现状[J].南方农业,2016,10(31):24-27.
- [32] 杨桂秋,黄琦,陈霖,等.新型杀虫剂溴氧虫酰胺研究概述[J].世界农药,2012,34(6):19-21.
- [33] 陈羿渠,向兴,贡常委,等.氯虫苯甲酰胺亚致死剂量对甜菜夜蛾主要解毒酶活性与生长繁殖的影响[J].中国农业科学,2017,50(8):1440-1451.
- [34] XU C M, ZHANG Z Q, CUI K D, et al. Effects of sublethal concentrations of cyantraniliprole on the development, fecundity and nutritional physiology of the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(6): e0156555.
- [35] 张林林,李艳红,仵均祥.不同寄主植物对小地老虎生长发育和保护酶活性的影响[J].应用昆虫学报,2013,50(4):1049-1054.
- [36] 韩永强,文礼章,侯茂林.水稻施用硅肥对稻纵卷叶螟幼虫保护酶和解毒酶活性的影响[J].应用昆虫学报,2016,53(3):482-490.
- [37] 刘建业,钱蕾,蒋兴川,等.CO₂浓度升高对西花蓟马和花蓟马成虫体内解毒酶和保护酶活性的影响[J].昆虫学报,2014,57(7):754-761.
- [38] 刘玉坤,王渭霞,傅强,等.寄主植物对3种稻飞虱解毒酶和保护酶活性的影响[J].中国水稻科学,2011,25(6):659-666.
- [39] 邢剑飞,刘艳,颜冬云.昆虫对拟除虫菊酯农药的抗性研究进展[J].环境科学与技术,2010,33(10):68-74.
- [40] 罗雁婕,高希武,吴文伟,等.药剂对小菜蛾抗性及其敏感品系乙酰胆碱酯酶抑制作用比较[J].农药学学报,2008,10(2):211-216.
- [41] 何运转,李梅,冯国蕾,等.拟除虫菊酯对家蝇 Na-K-ATPase 抑制作用的研究[J].昆虫学报,1999,42(1):19-24.
- [42] 魏波,郝赤,李会仙.杀虫剂亚致死剂量对棉铃虫靶标酶的影响[J].现代农药,2006,5(3):35-38.

细胞数量等生理指标有显著影响。黏虫幼虫在受到侵染后,虫体会通过体液免疫和细胞免疫的共同作用而产生防御反应。本文对黏虫防御行为-免疫应答间的关系提供了一定的理论依据,对揭示黏虫抵抗病原体侵染的能力、机理及黏虫成灾机制具有重要意义。

参考文献

- [1] LAMBERTY M, ADES S, UTTENWEILER-JOSEPH S, et al. Insect immunity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(14): 9320-9326.
- [2] LAVINE M D, STRAND M R. Insect hemocytes and their role in immunity [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2002, 32(10): 1295.
- [3] SCHMIDT O, THEOPOLD U, STRAND M. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids [J]. *Bioessays*, 2001, 23(4): 344-351.
- [4] 卢亚萍,潘宏涛. Aegis 溶菌酶的抑菌作用及抑菌机理初步研究[J]. *饲料与畜牧*, 2007(12): 15-17.
- [5] LEONARD C, RATCLIFFE N A, ROWLEY A F. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1985, 31(10): 789-799.
- [6] 李志强,陈国生,王茂先,等. 昆虫体液免疫的分子生物学[J]. *生命的化学*, 2003, 23(5): 348-351.
- [7] ADAMO S A, WEBSTER J P. Neural parasitology: how parasites manipulate host behaviour [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(1): 1-2.
- [8] REYNOLDS J J H, WHITE A, SHERRATT J A, et al. The population dynamical consequences of density-dependent prophylaxis [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2011, 288(1): 1-8.
- [9] 李光博,王恒祥,胡文绣. 粘虫季节性迁飞为害假说及标记回收试验[J]. *植物保护学报*, 1964, 3(2): 101-110.
- [10] 江幸福,张蕾,程云霞,等. 我国粘虫研究现状及发展趋势[J]. *应用昆虫学报*, 2014(4): 881-889.
- [11] 张云慧,张智,姜玉英,等. 2012 年三代黏虫大发生原因初步分析[J]. *植物保护*, 2012, 38(5): 1-8.
- [12] 江幸福,张蕾,程云霞,等. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析[J]. *应用昆虫学报*, 2014, 51(6): 1444-1449.
- [13] 姜玉英,李春广,曾娟,等. 我国粘虫发生概况:60 年回顾[J]. *应用昆虫学报*, 2014, 51(4): 890-898.
- [14] 罗礼智,徐海忠,李光博. 粘虫幼虫密度对幼虫食物利用率的影响[J]. *昆虫学报*, 1995, 38(4): 428-435.
- [15] 罗礼智,李光博,曹雅忠,等. 粘虫幼虫密度对成虫飞行与生殖的影响[J]. *昆虫学报*, 1995, 38(1): 38-45.
- [16] 白毓昕. 幼虫密度对粘虫生长发育及防御能力的影响[D]. 武汉:华中农业大学,2010.
- [17] 吕伟祥,江幸福,张蕾,等. 一日龄粘虫不同时长吊飞对生殖及寿命的影响[J]. *应用昆虫学报*, 2014, 51(4): 914-921.
- [18] 陈文柱,李兵,贡成良,等. 酚氧化酶在家蚕血淋巴中的活力分布及影响因素的研究[J]. *江苏蚕业*, 2005, 27(2): 12-15.
- [19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 3177-3188.
- [20] WILSON K, THOMAS M B, BLANFORD S, et al. Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts [J]. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 2002, 99(8): 5471-5475.
- [21] 赵娇,戚晓玉,尤瑜敏,等. 日本对虾的酚氧化酶特性研究[J]. *上海海洋大学学报*, 1997(3): 157-165.
- [22] 董文娟,王学英,张涛,等. 柞蚕滞育蛹抗菌物质产生及其抑菌活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(4): 990-991.
- [23] 张国洲,王亚维,徐汉虹. β -谷甾醇等化合物对昆虫血淋巴蛋白含量的影响[J]. *湖北农学院学报*, 2000, 20(3): 201-202.
- [24] 刘守柱,杜学林,戴明勋. 昆虫酚氧化酶特性及其生理学功能[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(34): 19249-19251.
- [25] 孟海燕,张亚琴,王林华,等. 颗粒体病毒对小菜蛾幼虫酚氧化酶及保护酶活性的影响[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 44(2): 274-277.
- [26] GLINSKI Z, JAROSZ J. Mechanical and biochemical defences of honey bees [J]. *Bee World*, 1995, 76(3): 110-118.
- [27] 许兵红,陈正耀. 昆虫体液免疫中的抗菌物质[J]. *昆虫知识*, 1999, 36(5): 316-319.
- [28] 邓日强,利翠英. 斜纹夜蛾幼虫感染核型多角体病毒后血细胞的病理变化[J]. *中山大学学报论丛*, 1995(2): 18-20.
- [29] 贺媛. 亚剂量氟铃脲对昆虫免疫的干扰机制及血细胞高通量药物筛选[D]. 上海:华东理工大学,2011.

(责任编辑:田 喆)

(上接 96 页)

- [43] 贾变桃,洪珊珊,张雨超,等. 阿维菌素对半闭弯尾姬蜂保护酶系和解毒酶系的影响[J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38(5): 990-995.
- [44] 廖月枝,严善春,李小平,等. 甲氧虫酰胺对舞毒蛾幼虫保护酶活性的影响[J]. *林业科学*, 2011, 47(9): 93-99.
- [45] 张文成,王开运,牛芳,等. 虫螨腈胁迫对甜菜夜蛾保护酶系和解毒酶系的诱导效应[J]. *植物保护学报*, 2009, 36(5): 455-460.
- [46] 杨琼,王淑会,张文慧,等. 常用杀虫剂对异色瓢虫的毒力及其保护酶的影响[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(2): 258-263.
- [47] 齐浩亮,崔丽,王芹芹,等. 溴虫氟苯双酰胺对小菜蛾的毒力及
- 相关酶活性的影响[J]. *植物保护*, 2017, 43(1): 112-116.
- [48] 余慧灵,向兴,袁贵鑫,等. 溴氰虫酰胺亚致死剂量对甜菜夜蛾生长发育及体内解毒酶活性的影响[J]. *昆虫学报*, 2015, 58(6): 634-641.
- [49] RUMPF S, HETZEL F, FRAMPTON C. Lacewings (Neuroptera: Hemerobiidae and Chrysopidae) and integrated pest management: enzyme activity as biomarker of sublethal insecticide exposure [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1997, 90(1): 102-108.

(责任编辑:田 喆)