

转 Bt 基因稻谷对印度谷螟生长发育的影响^{*}

蒋海燕^{1**} 王振华^{2***} 华红霞¹ 高良亮¹ 蔡万伦¹ 杨长举¹

(1. 华中农业大学植物科技学院城市有害生物防治研究所, 湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室 武汉 430070; 2. 湖北出入境检验检疫局 武汉 430050)

摘 要 为建立仓储阶段转 Bt 水稻安全性评价中靶标害虫抗性汰选研究体系, 配制了含不同比例(70%, 50%, 30%, 10%) 转 Bt 基因(*Cry1Ab/Cry1Ac*) 明辉 63 水稻谷粉(简称 Bt 谷粉)的人工饲料饲喂印度谷螟 *Plodia interpunctella* (Hübner), 测定其对 1~3 龄幼虫在 72 h 内的急性毒力, 及对印度谷螟种群生长发育的影响, 并采用 ELISA 法检测转基因稻谷和末龄幼虫体内 Bt 蛋白含量。结果发现: 4 种比例人工饲料对幼虫的毒力作用均发生在取食 48 h 后, 72 h 后剂量效应明显。含 Bt 水稻较高比例的饲料对印度谷螟发育的负面效应明显: 幼虫死亡率高, 发育历期延长。Bt 蛋白在幼虫体内含量与对应饲料中的含量基本成正比。综合考虑, 将 Bt 杀虫蛋白含量 2.35 $\mu\text{g/g}$ 作为转 Bt 基因稻谷对印度谷螟的亚致死剂量最为合适。

关键词 转 Bt 基因水稻, 印度谷螟, 急性毒力, 种群发育, 亚致死剂量

Effects of transgenic Bt (*Cry1Ab/Cry1Ac*) rice on the population development of *Plodia interpunctella*

JIANG Hai-Yan^{1**} WANG Zhen-Hua^{2***} HUA Hong-Xia¹ GAO Gen-Liang¹
CAI Wan-Lun¹ YANG Chang-Ju¹

(1. Hubei Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory, Institute of Urban Pest, Plant Science and Technology College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Hubei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. C., Wuhan 430050, China)

Abstract The effect of the transgenic Bt rice *Cry1Ab/Cry1Ac* gene on the feeding of *Plodia interpunctella* (Hübner) on stored rice was investigated. Population parameters of *P. interpunctella* were investigated after adding different ratios (70%, 50%, 30%, 10%) of transgenic Bt rice flour into a conventional artificial diet at 30°C and RH75%. The content of Bt protein in 3rd instar larva and the transgenic Bt rice grain was measured using the ELISA method. The results show that significant mortality of 1st instar larva was observed 72 h after feeding on Bt rice flour. Larval mortality rates and development time increased significantly as the content of transgenic Bt rice flour in the artificial diet increased. For research purposes, 2.35 $\mu\text{g/g}$ was the optimal sub-lethal dose of *Cry1Ab/Cry1Ac* protein for *P. interpunctella*.

Key words Bt rice, *Plodia interpunctella*, acute toxicity, population development, sub-lethal dose

20 世纪末, 一系列转 Bt 基因抗虫水稻的培育获得成功(Tu *et al.*, 2000), 这为水稻田间虫害控制、减少化学农药使用和粮食紧缺等问题的解决开辟了一条崭新的途径。但是, 转基因水稻能否顺利商业化, 生物安全评价工作必须通过的首要环节。现有多数研究表明, 在大田生长阶段, 转

Bt 基因水稻对田间节肢动物及群落影响无负面作用(刘志诚等, 2003; 刘雨芳等, 2005), 对非靶标动物影响不显著(O'Callaghan *et al.*, 2005), 但也有研究表明 Cry 蛋白可以通过食物链对非靶标生物, 如捕食性天敌和寄生性天敌产生不良影响(陈茂等, 2005; 姜永厚等, 2005), 因此转 Bt 水稻

^{*} 资助项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08011-001)。

^{**} E-mail: jenny19860720@126.com

^{***} 通讯作者, E-mail: dadi_jinling@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-11-10, 接受日期: 2010-12-27

的大面积推广,是否会对田间生态系统造成不良影响,间接产生更多的生态问题,这将是目前急需解决的问题。

我国最早从 1999 年就开始进行与生物安全评价相关的工作,工作重心主要集中于大田环境下各个环节上的生态安全评价(韩兰芝等,2006),而相应的生产加工环节上的安全性评价工作主要集中在最为敏感的食品安全部分(贺晓云等,2008),而同样重要的储藏环节,却一直缺乏系统全面的研究。转 Bt 稻谷商业化指日可待,储藏阶段作为必然经过的环节,还需要大量的相关试验来解决诸如:对仓储害虫靶标、非靶标及群落的影响、Bt 稻谷自身的品质变化,Bt 粮仓的科学化管理等问题。

印度谷螟 *Plodia interpunctella* (Hübner) 是一种发生普遍且危害严重的世界性仓储害虫(陈耀溪,1984)。一些早期的研究证实印度谷螟对 Bt 杀虫蛋白具有抗性,低浓度的杀虫蛋白不会造成虫体的死亡(Knell *et al.*, 1996)。Akinkulere 等(2009)对苏云金芽孢杆菌和麦蛾柔茧蜂对印度谷螟联合控制作用进行了研究,提供了一些印度谷螟对 BT 毒性的毒理反应和相关的生物学参数。本研究在参考前人的基础上,选择了印度谷螟作为一种典型的储粮害虫,设计展开了一系列与田间生态评价内容相类似的评估性试验来检测转 Bt 基因水稻对储粮害虫的急性毒力和生长发育的长期影响。这不仅是对该品种 Bt 水稻安全评价工作的重要补充,还可以为今后不断出现的新转基因品种评价提供一个应用方案,以及对将要商业化的品种在仓储阶段的靶标害虫抗性管理策略提

供实践依据。

1 材料与方法

1.1 供试水稻品种

供试水稻为转 Bt 基因(*Cry1Ab/ Cry 1Ac*)明辉 63 水稻(Tu *et al.*, 2000),非转 Bt 基因明辉 63 水稻稻谷。均由华中农业大学生命科学院提供。

1.2 供试昆虫

供试昆虫印度谷螟采自武汉中储粮潞口粮库,在华中农业大学城市有害生物防治研究所养虫室置于人工气候箱中(相对湿度 70% ~ 80%,温度 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$,黑暗),参照方杰等(2003)提供的方法与思路,以及朱金娥和金振玉(1999)对于防腐剂的研究,用改进了的人工饲料(酵母 1%,蜂蜜 15%,甘油 10%,丙酸 0.05%,碎麦粒 73.95%)饲养 5 代以上,作为正式实验的虫源。

1.3 实验方法

1.3.1 不同 Bt 杀虫蛋白含量的人工饲料喂养

用粉碎机分别将 Bt 稻谷与非 Bt 稻谷粉碎,过 100 目筛,得到的谷粉冷藏备用。

参照改进的人工饲料配方,将碎麦粒替换成面粉,通过加入不同比例的转 Bt 基因稻谷谷粉,设置含 Bt 杀虫蛋白 4 个浓度的处理(表 1,4 个浓度为 70%、50%、30%、10%),同时设置对应浓度的非转基因稻谷的对照(除配方中的谷粉采用非转 Bt 基因稻谷,其余成分及比例和表 1 相同)

按配方比例制备人工饲料,每 100 g 加 20 g 蒸馏水,充分混匀后将其捏成约 0.5 cm^3 的小块备用。

表 1 含不同比例转 Bt 基因水稻谷粉的人工饲料配方

Table 1 Different ratios of transgenic Bt (*Cry1Ab/ Cry 1Ac*) rice-flour in the artificial diet

配方号 No. Formula	酵母 Yeast(%)	蜂蜜 Honey(%)	甘油 Glycerol(%)	丙酸 Methyl acetic acid(%)	面粉 Wheat flour(%)	Bt 谷粉 Bt rice flour(%)
1	1	15	10	0.05	3.95	70
2	1	15	10	0.05	23.95	50
3	1	15	10	0.05	43.95	30
4	1	15	10	0.05	63.95	10

1.3.2 转 Bt 基因水稻对印度谷螟种群发育的影响 将上述 8 种配方的人工饲料各取 50 g 加入到一个消毒烘干过的玻璃罐中,接入用普通饲料饲

养的初孵幼虫 50 头,用黑布封紧罐口,把所有玻璃罐放入智能光照培养箱中,在 30°C ,75% 的湿度下饲养,每个配方设置 3 个重复。另外以全部面

粉替代碎麦粒,其他与饲养虫源用的人工饲料相同的配方作为空白对照(CK),重复3次。此后定期观察试虫的取食和活动状况,当饲料不足时及时更换,记录其化蛹、羽化情况。

1.3.3 转 Bt 基因水稻对印度谷螟的毒力测定 将上述8种配方的人工饲料各取50 g 加入到一个消毒烘干过的玻璃罐中,每个玻璃罐中接入用普通饲料饲养的初孵幼虫60头,用黑布封紧罐口,把所有玻璃罐放入智能光照培养箱中,在30℃,75%的湿度下培养,每个配方设置3个重复,分别在24、48、72 h 取各个处理的3瓶重复检查存活情况。

1.3.4 转 Bt 基因水稻杀虫蛋白含量的测定 准确称取30 mg 饲料配方中所用转 Bt 稻谷谷粉,重复3次;从饲养试验中每一组配方中分别挑选出3头3龄幼虫,饥饿72 h 后迅速加液氮研磨成粉,-70℃冻存,重复3次。上述样本的Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白含量利用蛋白试剂盒(Ap003 CBRS, Qualiplate kit for Cry1Ab/Cry1Ac, 美国 Envirologix 公司),按照其操作指导进行测定。所有结果均换算成每克干重含有的 Bt 杀虫蛋白微克量,用 $\mu\text{g/g}$ 表示。

1.4 数据处理

对于连续72 h 观测的死亡率数据,经反正弦转换后,首先利用 SAS 软件 GLM 过程对其进行重复观测数据的多元方差分析(Repeated Measures Analysis of Variance, Manova),如若结果出现试验

因素与时间交互作用显著,则对于每个时间节点的观测数据利用 ANOVA 过程进行双因素方差分析,LSD 法检验差异显著性。生物学试验中得到的幼虫死亡率、化蛹率、羽化率、发育历期数据则直接进行单因素方差分析,LSD 法检验差异显著性,其中前三者在方差分析前进行反正弦转换,历期数据则进行对数转换。

2 结果与分析

2.1 不同时段不同杀虫蛋白含量人工饲料对初孵印度谷螟幼虫的活性

Manova 分析表明,随着处理时间延长,幼虫死亡率显著增高($F = 55.63, P < 0.001$),谷粉含量比例、谷粉品种2个因素分别与时间的交互作用显著(依次 $F = 11.69, P = 0.0001$; $F = 3.08, P = 0.0149$)。接虫24 h 后,不同谷粉含量比例对印度谷螟幼虫致死作用显著($F = 8.399, P = 0.0014$),但谷粉品种对其影响不明显。接虫48 h 后,无论 Bt 还是非 Bt,谷粉含量比例对幼虫存活影响不显著,每一个配方与自身24 h 时刻的观测值比,死亡率呈明显升高的趋势。同时,不同品种对幼虫死亡影响差异显著($F = 18.874, P = 0.0005$),在谷粉比例超过10%以后,均为 Bt 饲料配方显著高于同含量的非 Bt 谷粉饲料配方。这表明,Bt 杀虫蛋白的杀虫效果已经开始在较高浓度的处理上显示出来。

表2 含不同比例水稻粉人工饲料饲喂后初孵印度谷螟幼虫死亡率

Table 2 Mortality of 1st instar larvae of *Plodia interpunctella* fed by different ratio rice-flour in the artificial diet

处理时间 Time	饲料类型 Artificial diet	死亡率 Mortality ratio(%)			
		70% *	50% *	30% *	10% *
24 h	Bt	15.14 ± 1.60abA	21.94 ± 1.28aA	15.49 ± 1.41abA	7.94 ± 1.87bA
	Non-Bt	9.52 ± 2.02bA	24.26 ± 3.19aA	15.74 ± 3.42abA	10.48 ± 2.21bA
48 h	Bt	35.00 ± 2.52aA	44.92 ± 2.78aA	43.85 ± 5.66aA	31.47 ± 1.92aA
	Non-Bt	16.77 ± 2.66aB	24.20 ± 1.72aB	23.33 ± 6.85aB	27.52 ± 4.83aA
72 h	Bt	71.61 ± 2.06aA	54.75 ± 1.23abA	48.50 ± 8.14bA	29.30 ± 1.31cA
	Non-Bt	27.83 ± 5.79aB	34.47 ± 4.51aB	19.12 ± 5.80aB	33.39 ± 3.94aA

注:表中数据为平均值 ± 标准误($n = 3$),同行不同小写字母表示同一品种不同谷粉含量间存在显著差异, $P < 0.05$,同列不同大写字母表示同一谷粉含量不同品种稻谷间存在显著差异, $P < 0.05$ 。* 表示稻谷粉在饲料中的重量百分比。

The data in the table are mean ± SE($n = 3$), and followed by different lowercase letters in the same row or by different uppercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level by LSD test, respectively. The data before * are the percentage of rice flour in the diet.

接虫 72 h 后,谷粉含量对幼虫存活影响显著 ($F = 4.177, P = 0.023$)。从表 2 可以看到,随着 Bt 谷粉含量增高死亡率显著增加,含 70% Bt 谷粉饲料饲喂幼虫的死亡率达 72%,与 48 h 结果相比 (35%) 又上升了 1 倍。但在含非 Bt 谷粉的饲料中,不同含量配方处理间幼虫死亡率差异并不显著,基本与 48 h 结果持平。谷粉品种对幼虫存活的影响仍呈显著差异 ($F = 28.08, P = 0.0001$),且均是 Bt 饲料配方极显著高于同含量的非 Bt 谷粉饲料配方。上述结果表明,Bt 杀虫蛋白的杀虫效果随浓度的增高而明显的显示出来,但含 10% Bt 谷粉的处理基本不对印度谷螟幼虫基本不产生致死效果。

2.2 不同含量 Bt 谷粉对印度谷螟的种群发育的

影响

含有不同比例的 Bt 谷粉对印度谷螟的幼虫存活影响显著 ($F = 3026.215, P < 0.05$)。含 70% 转 Bt 基因谷粉的饲料,其幼虫死亡率高达 89%,显著高于其他各个处理,随着 Bt 谷粉含量的降低,死亡率逐渐降低。当 Bt 谷粉含量降低至 10% 时,与各个非 Bt 谷粉饲料以及 CK 的幼虫死亡率相互间已无显著差异,均在 20% 左右。同时,上述结果也表明,非 Bt 谷粉对幼虫的存活基本无明显负面影响(图 1)。Bt 谷粉含量对印度谷螟化蛹率及羽化率影响显著,随着 Bt 谷粉含量的降低,印度谷螟的化蛹率及羽化率明显呈上升趋势,当 Bt 谷粉含量降低至 10% 时,与其他含有非 Bt 谷粉的饲料及对照差异已不明显。

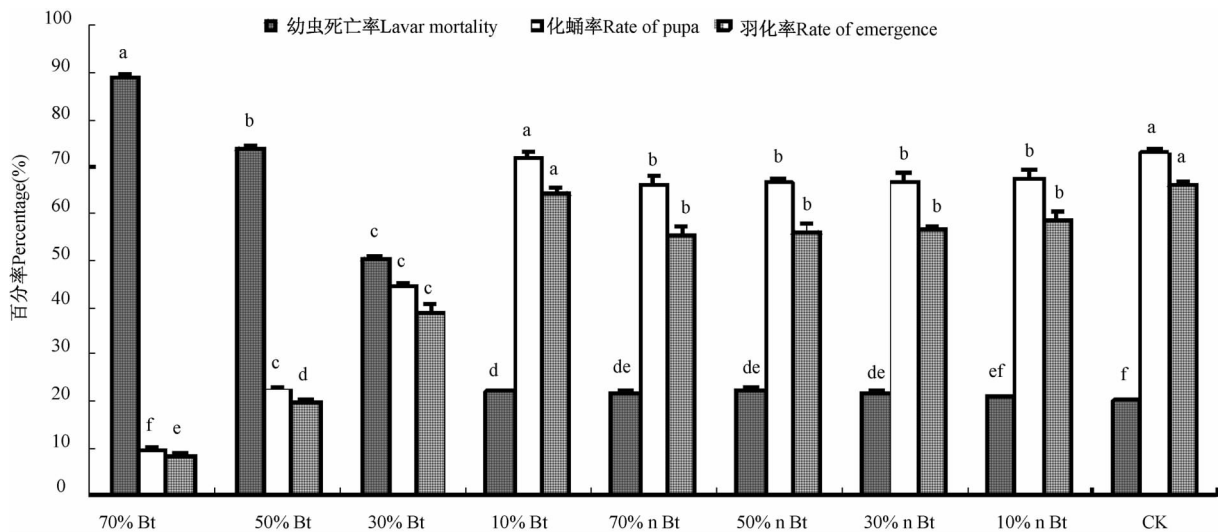


图 1 不同配方饲料饲喂的印度谷螟生物特性参数

Fig.1 Population parameters of *Plodia interpunctella* fed by different ratios of transgenic Bt rice-flour

Bt, nBt 分别指为人工饲料中含有转 Bt 基因稻谷粉或非转 Bt 基因稻谷粉,前面的数字代表谷粉在饲料中质量比例,柱上不同字母代表同一参数不同处理间存在显著差异 $P < 0.05$,下同。

“Bt” and “nBt” means there were transgenic Bt rice and non-transgenic Bt rice flour in the artificial diet, respectively. The number before “Bt” or “nBt” means ratio of rice-flour in the diet. The different lowercase on the column means significant difference among different treatments at 0.05 level by LSD test. The same below.

不同配方饲料对印度谷螟的幼虫以及总的发育历期影响极其显著(分别为 $F = 56.14, P < 0.05$; $F = 12.21, P < 0.001$)。在含 Bt 谷粉的饲料中,随稻谷粉含量的增加,印度谷螟的幼虫发育历期及总历期显著延长,最高比例饲料与最低比例饲料饲喂的试虫总历期相差达到 10.8 d;在含有非 Bt 稻谷粉饲料中,则正好相反,随着稻谷粉比

例的增高,幼虫历期及总历期也随之显著缩短,最高比例与最低比例谷粉含量的饲料饲喂的试虫总历期相差达到 9.2 d(图 2)。扣除 CK 数据进行谷粉品种与谷粉含量 2 个因素的方差比较表明,当谷粉比例达到 30% 以下时,品种间的历期差异不显著;而当谷粉比例超过 30% 时,含 Bt 谷粉的饲料饲喂的试虫历期明显高于含非 Bt 谷粉的饲料。

蛹发育历期在各个配方间差异不显著,表明配方处理对印度谷螟在该阶段的影响较小(图2)。

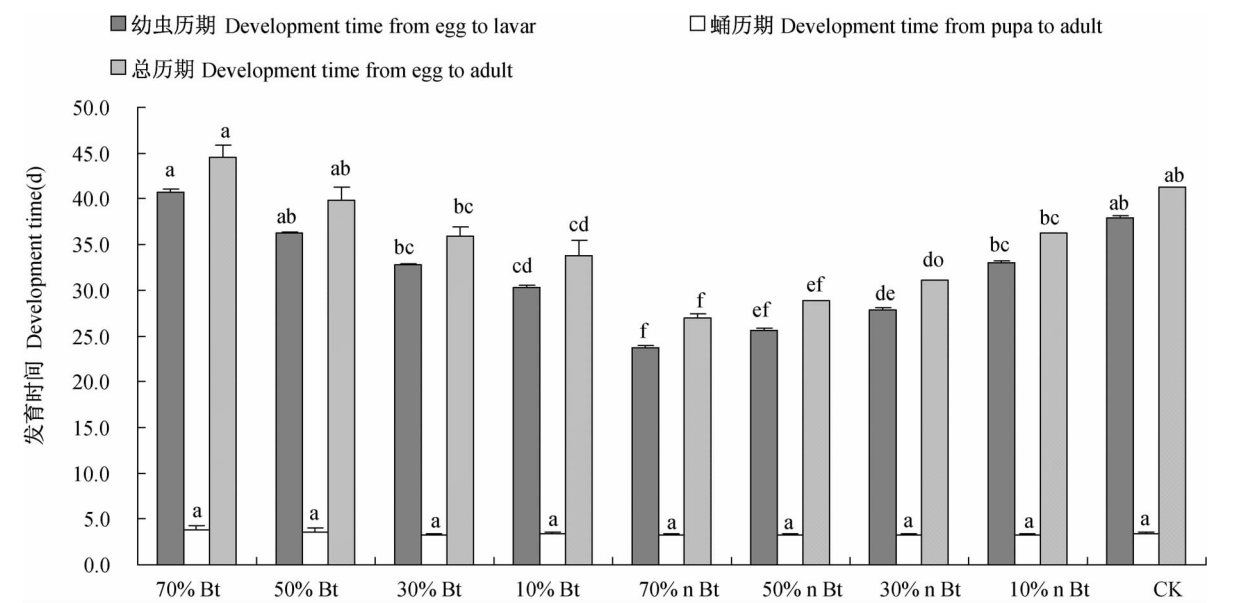


图2 不同配方饲料饲喂的印度谷螟的成虫历期
Fig. 2 Development time (from egg to adult) of *Plodia interpunctella* fed by different ratios of transgenic Bt rice-flour

2.3 取食不同含量 Bt 谷粉后印度谷螟幼虫杀虫蛋白含量

根据不同梯度(x)标样的吸光值(y),得到标准曲线 $y = 0.2893x + 0.0118$ ($R^2 = 0.9884$),进而得到待测样品的杀虫蛋白含量(表3)。可以看

到,随着 Bt 谷粉在饲料中的比例下降,残留在印度谷螟中的杀虫蛋白迅速下降,当 Bt 谷粉低于30%时,饲喂的幼虫中的杀虫蛋白在酶联免疫测定中仅有痕量反应。

表3 Bt 稻所配人工饲料及印度谷螟幼虫中的 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白含量(μg/g)				
Table 3 Content of Cry1Ab/Cry1Ac insecticidal protein in artificial diet and larvae of <i>Plodia interpunctella</i> (μg/g)				
杀虫蛋白含量	70% Bt 谷粉	50% Bt 谷粉	30% Bt 谷粉	10% Bt 谷粉
Content of insecticidal protein	70% Bt rice flour	50% Bt rice flour	30% Bt rice flour	10% Bt rice flour
人工饲料*	3. 28	2. 35	1. 41	0. 47
Artificial diet				
3 龄幼虫	2. 76 + 0. 16	0. 75 + 0. 12	—	—
3rd stage larvae				

注: * 表示饲料中杀虫蛋白含量根据测定纯 Bt 水稻的含量结果(4.69 μg/g)折算而来;幼虫的 Bt 杀虫蛋白含量为 ELISA 试剂盒直接测定的结果,其中“—”表示杀虫蛋白测定仅有痕量反应。
The content of Bt insecticidal protein in the artificial diet are measured with the content of Bt rice grain(4.69 μg/g); and the content of Bt in larvae is determined by ELISA kit. “—”means the content of Bt protein is trace.

3 讨论

靶标害虫对转 Bt 基因作物的抗性进化也是受众多科研人员关注的问题。选择合适的亚致死

剂量进行室内汰选,是研究抗性进化的经典而又实用的方法(王小艺和沈佐锐,2002)。因此,在储藏阶段对转 Bt 基因水稻进行安全性评价,选择合适的靶标害虫,合适的亚致死剂量,是评价靶标害

虫对 Bt 抗性进化的关键。尽管印度谷螟很少危害完整稻谷,但它是最早发现对 Bt 产生抗性的室内昆虫 (McGaughey, 1985), 这说明印度谷螟对 Bt 制剂的抗性进化速度很快。因此,只要能解决用人工饲料配方饲养,允许定量加入含杀虫蛋白稻谷,作为标准试虫来评价转 Bt 稻谷在储藏阶段的安全性,无疑具有重要意义。从本研究结果来看,无论杀虫蛋白含量高低,起作用的时间均是在幼虫取食 48 h 后,出现明显剂量效应在 72 h 后。Bt 杀虫蛋白含量为 $2.35 \mu\text{g/g}$ 时(谷粉含量 50% 的配方),印度谷螟幼虫 72 h 内有近 20% 的存活,从 Bt 水稻对印度谷螟种群发育参数影响试验结果来看,相应的印度谷螟幼虫有近 20% 的存活,饲养周期为 40 d(图 2),将这个浓度作为亚致死剂量进行抗性汰选研究较为合适。

此外,从本研究还可以看出,现有的以面粉为主的人工饲料饲喂印度谷螟仍不理想,尽管幼虫成活率接近 80% (图 1),但发育历期与 Bt 谷粉含量最高的人工饲料饲喂的试虫相差不大(图 2)。同时,含有非 Bt 谷粉的人工饲料比例不同也明显影响试虫的发育历期,考虑到谷粉的粒度粗于加工的面粉(800 目左右),在加入相同质量水的情况下,饲料中谷粉比例越小,则表面越粘稠。是否是饲料粘稠度对其取食造成的不利影响有待进一步确认。

致谢:感谢参与本研究的 06 级动植物检疫班张群芝、白海峰、肖奎、鞠建新同学以及 05 级植物保护班的赵铁军、吴宇颖同学。

参考文献 (References)

Akinkulere RO, Rao Q, Wang X, Zhang H, 2009. Effect of *Bacillus thuringiensis* on *Habrobracon hebetor* during combined biological control of *Plodia interpunctella*. *Insect Sci.*, 16(5):409—416.

陈茂,叶恭银,卢新民,胡萃,彭于发,舒庆尧,Altosaar I,

2005. Cry1Ab 杀虫蛋白在水稻-褐飞虱-拟水狼蛛食物链中转移与富集. *昆虫学报*, 48(2):208—213.

陈耀溪, 1984. 仓库害虫. 北京:农业出版社. 355—357.

方杰,朱麟,杨振德,赵博光, 2003. 昆虫人工饲料配方研究概况及问题探讨. *四川林业科技*, 24(4):18—26.

韩兰芝,吴孔明,彭于发,郭予元, 2006. 转基因抗虫水稻生态安全性研究进展. *应用与环境生物学报*, 12(3):431—436.

贺晓云,黄昆仑,秦伟,罗云波, 2008. 转基因水稻食用安全性评价国内外概况. *食品科学*, 29(12):760—765.

姜永厚,傅强,程家安,祝增荣,蒋明星,张志涛, 2005. 转 *scK + cry1Ac* 基因水稻对二化螟及二化螟绒茧蜂存活和生长发育的影响. *昆虫学报*, 48(4):554—560.

Knell RJ, Begon M, Thompson DJ, 1996. Transmission dynamics of *Bacillus thuringiensis* infecting *Plodia interpunctella*: a test of the mass action assumption with an insect pathogen. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 263(1366):75—81.

刘雨芳,苏军,尤民生,汪琼,胡斯琴,刘文海,赵士熙,王锋, 2005. 转基因抗虫水稻对水稻害虫群落的影响. *昆虫学报*, 48(4):544—553.

刘志诚,叶恭银,胡萃, 2003. 转 Cry I Ab/Cry I Ac 基因籼稻对稻田节肢动物群落影响. *昆虫学报*, 46(4):454—465.

McGaughey WH, 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229(4709):193—195.

O'Callaghan M, Glare TR, Burgess EPJ, Malone LA, 2005. Effects of plants genetically modified of insect resistance on nontarget organisms. *Annu. Rev. Entomol.*, 50:271—292.

Tu JM, Zhang GA, Data K, Xu CG, He YQ, Zhang QF, Khush GS, Datta SK, 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nat. Biotech.*, 18(10):1101—1104.

王小艺,沈佐锐, 2002. 亚致死剂量杀虫剂对异色瓢虫捕食作用的影响. *生态学报*, 22(12):2278—2284.

朱金娥,金振玉, 1999. 家蚕人工饲料防腐剂的. *粮食与饲料工业*, (1):38—39.

氟虫腈对小菜蛾幼虫体内解毒酶的影响^{*}

谢苗^{1,2} 尤民生^{1**}

(1. 福建农林大学应用生态研究所 福州 350002; 2. 福建农林大学生命科学学院 福州 350002)

摘 要 本文从解毒酶系的角度研究了小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 对氟虫腈的短期生理生化响应。用氟虫腈 LC₅₀ 剂量处理小菜蛾 3 龄幼虫一定时间后, 测定小菜蛾幼虫体内多功能氧化酶 (MFO)、酯酶 (EST) 和谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活性的动态变化。研究结果表明: 经氟虫腈处理后小菜蛾体内解毒酶的活性均显著高于未经处理的对照, 并且随着处理时间的延长, 解毒酶活性逐渐提高。这说明氟虫腈对小菜蛾敏感品系的解毒酶具有一定的诱导作用, 反之, 解毒酶加快了小菜蛾体内对氟虫腈的代谢, 降低了小菜蛾对氟虫腈的敏感性。

关键词 小菜蛾, 氟虫腈, 生理响应, 解毒酶

Effects of fipronil on detoxifying enzyme activities in *Plutella xylostella*

XIE Miao^{1,2} YOU Min-Sheng^{1**}

(1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. School of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract The short-term physiological responses of the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.) to fipronil were studied by measuring detoxifying enzyme activity in 3rd instar larvae. Significantly higher activity of the detoxifying enzymes, mixed-function oxidase (MFO), esterase (EST) and glutathione S-transferase (GST) was found in DBM larvae treated with an LC₅₀ value of fipronil compared to the fipronil-free controls. Our results show that fipronil may induce the activities of these three detoxifying enzymes in susceptible strains of DBM and that increased activity of these enzymes reduced the sensitivity of DBMs to fipronil.

Key words *Plutella xylostella*, fipronil, physiological-response, detoxifying enzyme

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 是世界性的十字花科蔬菜的主要害虫 (Talekar and Shelton, 1993), 化学防治一直是治理小菜蛾的重要手段, 但由于其繁殖速度快, 世代重叠严重, 对各种杀虫剂都能很快地产生抗药性 (Takeda *et al.*, 2006)。抗药性问题已经成为药剂防治小菜蛾的主要障碍, 而新的化合物是治理抗性小菜蛾的有效手段之一。氟虫腈 (fipronil) 是首个用于有害生物防治的苯基吡唑类杀虫剂, 主要是通过昆虫神经中枢细胞膜上的 γ -氨基丁酸 (GABA) 受体结合而阻塞神经细胞的氯离子通道, 从而干扰昆虫神经系统的正常功能而导致昆虫死亡, 对包括小菜蛾在内的多种经济害虫有防治作用 (Li *et al.*, 2006; Zhao and Salgado, 2010)。在杀虫剂进入昆虫体内

与靶标作用前, 解毒酶会参与对它们的代谢。代谢杀虫剂的解毒酶如多功能氧化酶、酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶, 一般会使有毒的外来化合物经过氧化、还原或水解等作用后, 使杀虫剂更容易从昆虫体内排出, 已有研究表明外源物质对昆虫解毒酶的诱导是和昆虫对杀虫剂的耐受力相关的 (Enayati *et al.*, 2005), 对昆虫抗性的发生与发展起着非常重要的作用。但不同杀虫剂或化合物对昆虫解毒酶的诱导水平及影响剂量存在差异, 如高希武等 (1997) 报道甲基对硫磷能诱导棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的谷胱甘肽 S-转移酶 (GST), 而灭多威则不能诱导 GST。

本研究以小菜蛾 3 龄幼虫为试验材料, 从解毒酶系的角度研究小菜蛾对氟虫腈的短期生理生

^{*} 资助项目: 福建省自然科学基金 (2010J01074)、农业部公益性行业科研专项经费 (200903034)。

^{**} 通讯作者, E-mail: msyou@iae.fjau.edu.cn

收稿日期: 2011-03-13, 接受日期: 2011-04-13

化响应。用亚致死浓度氟虫腈处理后,测定了小菜蛾 3 龄幼虫 24 h 内体内多功能氧化酶、酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶等酶活力的动态变化,分析氟虫腈对小菜蛾解毒酶系的影响,为深入研究小菜蛾的抗性发展机制及其有效治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

实验用小菜蛾为 2004 年 7 月采自福建福州市郊区新店,在室内经过长期培养的敏感品系,培养温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 60% ~ 80%,光周期 L:D = 16:8。成虫用 10% 蜂蜜饲养;幼虫在萝卜苗上取食生长。所有供试虫子均选用发育进度和个体大小一致的小菜蛾 3 龄幼虫。

1.2 试剂

对硝基苯酚、对硝基苯甲醚、还原型辅酶 II (NADPH)、 α -乙酸萘酯(α -NA)、固蓝 RR 盐、二巯基苏糖醇(DTT)、苯基硫脲(PTU)和苯甲基磺酰氟(PMSF)均为进口分装产品;其它试剂均为国产分析纯。

1.3 生物测定方法

参照浸叶法(Idris *et al.*, 2004):将氟虫腈原药(95%纯度)稀释成 6 个浓度梯度,并以清水(含 0.1% 吐温-20)设置空白对照组。将新鲜无污染的甘蓝(*Brassica oleracea*)叶片在系列药液中浸泡 10 s 后取出,室温晾干,将晾干后的叶片放置于培养皿中,并接入 10 头大小一致的 3 龄小菜蛾幼虫。每个浓度重复 3 次。处理后试虫的饲养条件:温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 65% ~ 75%,光照 16 h:黑暗 8 h。统计 24 h 后的死亡率,数据用 SPSS 15.0 软件处理,使用 Probit 回归分析计算 LC_{50} 值和 95% 置信限。

1.4 小菜蛾幼虫的药剂处理

配制 LC_{50} 浓度的氟虫腈药液,将其喷洒于新鲜无农药污染的幼嫩萝卜苗上,室内自然晾干,重复喷洒 3 次,然后接入已饥饿 4 h、大小一致的 3 龄小菜蛾幼虫,依据不同时间梯度,分别于 8、16 和 24 h 挑取仍存活的小菜蛾幼虫,于 -80°C 冰箱保存。以清水和含 0.1% 的吐温溶液作为对照组:用清水、含 0.1% 吐温的溶液分别喷洒于新鲜无农药污染的幼嫩萝卜苗上,室内晾干,重复喷洒 3

次,再分别接入已饥饿了 4 h、大小一致的 3 龄小菜蛾幼虫,依据不同时间梯度,分别于 0、8、16 和 24 h 后挑取出仍存活的小菜蛾幼虫,于 -80°C 冰箱保存,测定其多功能氧化酶、酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶的活性。每个处理 3 次重复。以清水处理为对照组,记为 CK;吐温组和氟虫腈药剂处理组分别记为 Tween 和 Fipronil。

1.5 解毒酶活性的测定方法

1.5.1 多功能氧化酶和酯酶的酶源制备 将 8 头大小一致的小菜蛾 3 龄幼虫置于预冷的研钵,加入 1 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8,含 1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、1 mmol/L PTU、1 mmol/L PMSF)中,冰浴匀浆,12 000 r/min, 4°C ,离心 10 min,取出上清液再次离心 30 min,所得上清液作为酶源(Li *et al.*, 2006),进行蛋白质定量。

蛋白质样品定量方法参照 Bradford 法(Bradford, 1976),以牛血清白蛋白(BSA)为参照蛋白。

1.5.2 多功能氧化酶(mixed-function oxidase, MFO)活性的测定 参考 Li 等(2006)的方法并加以改进。在 96 孔酶标板中加入 100 μL 2 $\mu\text{mol/L}$ 对硝基苯甲醚、10 μL 9.6 mmol/L NADPH 和 90 μL 酶液。用酶标仪在 405 nm 波长下,每隔 25 s 记录 1 次光密度值,记录 26 次,酶促反应阶段温度为 30°C ,以反应初速度值表示酶活($\Delta\text{OD}_{405\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$)。

1.5.3 酯酶(esterase, EST)活性的测定 参考黄水金等(2007)方法,在 96 孔板中加入 200 μL 底物与显色剂混合液(含 10 mmol/L α -NA 和 1 mmol/L 固蓝 RR 盐的 0.2 mol/L pH6.0 的磷酸缓冲液),再加入 20 μL 酶液。用酶标仪在 450 nm 波长下,每隔 30 s 记录 1 次光密度值,记录 20 次,酶促反应阶段温度为 27°C ,以反应初速度值表示酶活力($\Delta\text{OD}_{450\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$)。

1.5.4 谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)活性的测定 将 8 头小菜蛾的 3 龄幼虫置于预冷的研钵中,加入 1 mL ddH₂O,冰浴匀浆,匀浆液 3 600 r/min, 4°C 离心 15 min,取上清液作为酶源。酶活测定采用南京建成生物工程研究所的谷胱甘肽 S-转移酶(GST)测定试剂盒。其原理为 GST 具有催化还原型谷胱甘肽(GSH)与 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)结合的能力,在一