赤拟谷盗的磷化氢敏感和抗性品系体内羧酸酯酶的活性比较*

王殿轩[1]** 原 锴[2] 高希武[3]

(1. 河南工业大学 郑州 450052; 2. 北京市房山区植物保护站 北京 102488;
3. 中国农业大学 北京 100094)

Comparison of carboxylesterase acitivity between the resistant and susceptible strains of *Tribolium castaneum* to phosphine. WANG Dian-Xuan[1]**, YUAN Kai[2], GAO Xi-Wu[3] (1. *Henan University of Technology*, Zhengzhou 450052, China; 2. *Fangshan Plant Protection Station of Beijing*, Beijing 102488, China; 3. *China Agricultural University*, Beijing, 100094, China)

Abstract The specific activity of carboxlesterase from the resistant(with 327 resistance factor) and susceptible strain of *Tribolium castaneum* (Herbst) to phosphine was measured comparatively. Frequency distributing of the specific activity of the enzyme for both strains was analyzed further. The special activity of fumigated and un-fumigated insects was also determined for the comparison, with different concentration of phosphine in 24 h and different exposure time at concentration of 6.94×10^{-2} mg/L phosphine. The results showed the specific activity of carboxlesterase in larvae and pupae of resistant strain was 1.73 and 1.16 times higher than that of susceptible one for larvae and 1.16 times higher than that of susceptible strain, respectively. There was a significant difference in the frequency distribution of the specific enzyme activity between two strains in which the frequency of insect individuals with higher specific activity in resistant strain was more than that of susceptible insects. The specific enzyme activity from susceptible strain was decreased after 24 h fumigation at tested concentration of 0.69×10^{-2}, 2.78×10^{-2}, 5.56×10^{-2}, 8.33×10^{-2} and 11.11×10^{-2} mg/L apart, and that from resistance was increased after the fumigation with concentration of 5.56×10^{-2}、11.11×10^{-2}、13.89×10^{-2}、20.83×10^{-2} and 27.78×10^{-2} mg/L. The specific enzyme activity in susceptible strain was decreased and that of resistance strain was increased with the exposure time going on at the concentration 6.94×10^{-2} mg/L of phosphine. It revealed that the resistance to phosphine might be related to the activity of carboxlesterase in red flour beetle.

Key words phosphine, *Tribolium castaneum*, resistance strain, susceptible strain, carboxylesterase, specific activity comparison

摘 要 本文比较测定了赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst)的磷化氢抗性($R_f = 327$)和敏感品系害虫的羧酸酯酶活性,研究了该害虫同一品系不同个体间羧酸酯酶的活性差异,比较了两品系害虫在系列磷化氢浓度下熏蒸 24 h 和 6.94×10^{-2} mg/L 磷化氢浓度下熏蒸不同时间的羧酸酯酶活性。主要结果为:未熏蒸的抗性害虫幼虫和蛹体内的羧酸酯酶活性分别高于敏感品系的 1.37 和 1.16 倍;敏感和抗性害虫同品系内不同个体间羧酸酯酶活性分布频率都存在明显差异,抗性害虫中酶活性大的个体数量占的比例较大;磷化氢浓度分别为 0.69×10^{-2}、2.78×10^{-2}、5.56×10^{-2}、8.33×10^{-2} 和 11.11×10^{-2} mg/L 时都可导致敏感害虫羧酸酯酶的活性降低,但活性受抑制的程度不因浓度高低呈相应的增减。浓度分别

* 资助项目:河南工业大学高层次人才基金(2007BS003)。

** E-mail: wangdianxuan62@126.com

收稿日期:2009-04-19,修回日期:2009-05-20

为 5.56×10^{-2}、11.11×10^{-2}、13.89×10^{-2}、20.83×10^{-2}和 27.78×10^{-2} mg/L 的熏蒸中抗性害虫体内酶活性增加，且活性增高的程度与浓度增减也不呈对应变化。在 6.94×10^{-2} mg/L 磷化氢浓度下熏蒸不同时间的结果中，敏感害虫的酶活性随时间延长而下降，抗性害虫的活性则随时间延长而增大。研究表明赤拟谷盗对磷化氢的抗性可能与羧酸酯酶的活性增加有关。

关键词 磷化氢，赤拟谷盗，抗性品系，敏感品系，羧酸酯酶，活性比较

酯酶是昆虫体内重要的解毒酶系，对外源化合物的代谢和抗药性的形成有重要作用，其中羧酸酯酶（carboxylesterase，CarE，EC3.1.1.1）是研究较多的一种，它能水解脂族羧酸酯、芳族酯、芳族胺以及硫酯等酯类化合物，因而与昆虫对有机磷和拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性有关[1~4]。磷化氢作为储粮害虫的熏蒸剂，使用已有 70 多年，目前 80% 以上的储粮熏蒸杀虫都使用磷化氢，可能在相当长的时间内还要依赖它。储粮害虫对磷化氢已普遍存在抗药性问题，有的甚至相当严重[5]。对于磷化氢的杀虫机理目前说法不一。它虽非酯类杀虫剂，但虫体内酯酶与抗磷化氢的关系也曾有一些研究，如谢尊逸等报道，米象的磷化氢抗性品系的羧酸酯酶的活力高于敏感品系[1]。本文报道常见害虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（Herbst）受磷化氢处理后虫体内羧酸酯酶的活性，以及在抗性品系和敏感品系之间的差异。

1 材料与方法

1.1 试虫

试验用的赤拟谷盗磷化氢敏感品系由澳大利亚昆士兰州初级产品工业部于 10 年前赠送于河南工业大学储藏物昆虫研究室，在室内已培养多代。本研究中采用 FAO 推荐抗性方法[6]测定其对磷化氢的 LC_{50} 值为0.0057 mg/L（95% 置信限为 0.005 ~ 0.0059），回归方程为 $Y=12.614X+33.3542$，其抗性系数视为 $Rf=1$；磷化氢抗性品系采自中央储备粮商丘直属库，经前述方法测定得其 LC_{50} 值为1.8645 mg/L（95% 置信限为 1.445 ~ 2.4184），回归方程为 $Y=1.3886X+4.6243$，抗性系数 $Rf=327$。以上 2 品系均采用全麦粉加少量酵母在（28 ± 1）℃，65% ±5% 相对湿度条件下培养若干代。

1.2 化学药剂和仪器

试验采用的试剂 α-乙酸萘酯（α-NA）（98%）为 Sigma 公司产品；固蓝 B 盐（≥95%）为 Fluka 公司产品；十二烷基硫酸钠（SDS）（95%）为北京化学试剂厂产品。牛血清白蛋白（BSA）购自北京同正生物公司；考马斯亮蓝 G-250 为 Fluka 公司产品。其它试剂均为国产分析纯。

试验采用的主要仪器有 Eppendorf 5417R 离心机（30 × 1.5 mL，14 000 r/min），德国 Eppendorf 公司产品；OPTIZEN 2120UV 分光光度计（0.001），韩国美卡希斯公司产品；酶标仪（Microplate reader），奥地利 Tecan 公司产品（0.001）；1/10 000 g 电子天平（Sartorius 2004 MP），Opton 公司产品；电热恒温水浴锅，北京医疗设备厂产品（37 ~ 100℃，精度 ±1℃）。

1.3 虫体内羧酸酯酶的活性测定

1.3.1 未熏蒸试虫的处理 分别取赤拟谷盗敏感和抗性品系 2 d 龄的蛹和 5 龄的幼虫各 10 头，分别液氮研磨，加 pH 为 7.0、有效成分为 0.04 μg/L 的磷酸缓冲液匀浆。于 4 ℃，10 800 r/min，离心 15 min，上清液用单层滤纸抽滤。滤液存于 -85 ℃冰箱中，以备羧酸酯酶活性测定用。

1.3.2 不同浓度的熏蒸试验 取一定数量赤拟谷盗幼虫放入装有 10 g 饲料的玻璃瓶（Φ 45 mm × 110 mm）内，用橡胶塞密封瓶口，注入定量的磷化氢气体。对敏感品系采用了 0.69×10^{-2}、2.78×10^{-2}、5.56×10^{-2}、8.33×10^{-2}和 11.11×10^{-2} 5 个浓度梯度，熏蒸 24 h；对于抗性品系采用 5.56×10^{-2}、11.11×10^{-2}、13.89×10^{-2}、20.83×10^{-2}和 27.78×10^{-2} mg/L 5 个浓度梯度，熏蒸 24 h。然后散气。各浓度下熏蒸后取存活的幼虫用于羧酸酯酶活性测定。每

个浓度的熏蒸采用 3 个平行组的试虫,每组试虫为 50 头。

1.3.3　不同时间的熏蒸试验　分别取赤拟谷盗敏感和抗性品系的 5 龄幼虫放入装有 10 g 饲料的不同的熏蒸瓶(Φ 45 mm × 110 mm)内,用橡胶塞密封瓶口,注入磷化氢气体使其浓度为 6.94×10^{-2} mg/L,在设定时间分别为 0、12、48、72 和 120 h 时分别散气,取经检查存活正常的幼虫进行羧酸酯酶活性测定。熏蒸用的试虫数量同 1.3.1。

1.3.4　羧酸酯酶活性测定　对于前述熏蒸处理的赤拟谷盗敏感和抗性品系幼虫也采用 1.3.1 的处理制备滤液于 -85 ℃冰箱中存放以备羧酸酯酶活性测定。

参照 Van Aspern[7] 方法。取 α-NA (3×10^{-4} mol/L,含 3×10^{-4} mol/L 的毒扁豆碱)1.8 mL,加入一定体积的酶液,在 30 ℃的恒温水浴中反应 15 min。经酯酶水解后 α-NA 生成的 α-萘酚与 900 μL 的显色剂(质量分数为 5% SDS 与质量分数为 1% 固蓝 B 盐的体积比为 5∶2)作用呈现深蓝色,于 600 nm 处测定 OD 值。每组样品的活性测定重复 3 次或以上。

CarE 比活力 ($\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ protein) = (OD600·1 000) / ($T \cdot P$)。

式中 OD600 为 600 nm 下每分钟光吸收的变化值,T 为反应时间(min),P 为参与反应的酶液的蛋白含量(μg)。

1.3.5　敏感和抗性个体的羧酸酯酶活性测定　分别取 1 头蛹放入 1.5 mL 的离心管内,加入 600 μL pH 7.0、0.04 mol/L 的磷酸缓冲液匀浆。整个过程在冰浴中进行。于 4 ℃、10 800 r/min,离心 15 min,取上清液直接用于活性测定。

取上清液 30 μL 于酶标板的孔穴中,加入 120 μL 的底物 α-NA (3×10^{-4} mol/L,含 3×10^{-4} mol/L 的毒扁豆碱),在 30 ℃的恒温水浴中反应 15 min。最后加入 60 μL 的显色剂固蓝 B 盐作用呈现深蓝色,于 600 nm 处测定 OD 值,反应总体系为 210 μL。每个体样品的活性测定重复 3 次或以上。羧酸酯酶比活力的计算同 1.2.3。

1.3.6　蛋白含量的测定　参照 Bradford[8] 考马斯亮蓝 G-250 方法。

1.4　数据处理

试验数据采用 DPS 统计分析软件,Microsoft Excel 2000 和 Enzifit 软件(1.05 版本)处理。

2　结果与分析

2.1　敏感品系与抗性品系羧酸酯酶活性差异

测定不经磷化氢熏蒸处理的赤拟谷盗敏感和抗性品系的羧酸酯酶活力,结果见表 1。可以看出,不论是幼虫还是蛹,抗性品系体内羧酸酯酶活力都高于敏感品系,且差异极其显著。比较同一品系的 2 个虫态可以看出,幼虫体内的羧酸酯酶比活力要比蛹期高,这与虫体的不同生理状态有关。

表 1　赤拟谷盗磷化氢敏感和抗性品系体内 CarE 的比活力($\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$protein)

虫态	敏感品系 (S)	抗性品系 (R)	R/S
幼虫	$1.15 \pm 2.91 \times 10^{-2}$ A	$1.58 \pm 1.94 \times 10^{-2}$ B	1.37
蛹	$0.44 \pm 2.00 \times 10^{-2}$ A	$0.51 \pm 1.00 \times 10^{-2}$ B	1.16

表中数据为 M ± SD,数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

2.2　敏感品系与抗性品系内羧酸酯酶活性个体分布频率比较

测定赤拟谷盗磷化氢敏感和抗性害虫的同品系内不同个体的体内羧酸酯酶活性分布频率,结果见图 1。可以看出,敏感品系试虫中有 80% 的个体羧酸酯酶活性在 1 ~ 3 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$protein 的范围内,而抗性品系试虫中该酶活性在此范围的只有 33%。对于羧酸酯酶比活力大于 3 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$protein 情况,敏感品系中仅占 20%,而抗性品系中个体分布频率达到 67%。由此可见,赤拟谷盗磷化氢敏感和抗性品系内,个体间羧酸酯酶活性分布频率存在明显差异,抗性品系中比活力大的个体所占的比例大。

2.3　磷化氢熏蒸后赤拟谷盗感性和抗性品系的羧酸酯酶活性比较

2.3.1　磷化氢的不同熏蒸浓度对羧酸酯酶活

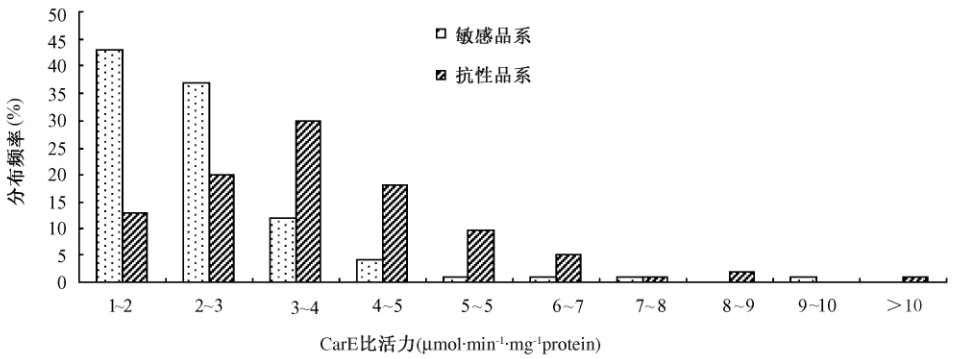

图 1 赤拟谷盗磷化氢敏感和抗性品系内蛹个体间 CarE 比活力大小分布

力的影响 赤拟谷盗敏感品系幼虫分别用 5 种磷化氢梯度浓度熏蒸 24 h，处理后测定活虫体内羧酸酯酶活性，结果见表 2。从表 2 可以看出，敏感品系试虫经过处理后，与不熏蒸时相比，羧酸酯酶比活力分别下降了 21.74%，20.00%，12.17%，14.78% 和 16.52%。说明磷化氢对赤拟谷盗敏感品系的羧酸酯酶起到了抑制作用。但其抑制的程度不因磷化氢浓度的高低呈相应的增减。

表 2 磷化氢不同浓度熏蒸 24 h 后敏感品系幼虫的 CarE 的活性比较

磷化氢有效成分 ($\times10^{-2}$mg/L)	比活力 (μmol·min^{-1}·mg^{-1}protein)	变化幅度 (%)
0	$1.15 \pm 2.91 \times 10^{-2}$	—
0.69	$0.90 \pm 3.90 \times 10^{-2}$	-21.74
2.78	$0.92 \pm 2.66 \times 10^{-2}$	-20.00
5.56	$1.01 \pm 2.98 \times 10^{-2}$	-12.17
8.33	$0.98 \pm 3.09 \times 10^{-2}$	-14.78
11.11	$0.96 \pm 1.36 \times 10^{-2}$	-16.52

表 3 不同磷化氢浓度熏蒸 24 h 后抗性品系幼虫的 CarE 的活性比较

磷化氢有效成分 ($\times10^{-2}$mg/L)	比活力 (μmol·min^{-1}·mg^{-1}protein)	变化幅度 (%)
0	$1.58 \pm 1.94 \times 10^{-2}$	—
5.56	$3.15 \pm 5.46 \times 10^{-2}$	+99.37
11.11	$2.18 \pm 5.91 \times 10^{-2}$	+37.97
13.89	$3.92 \pm 6.61 \times 10^{-2}$	+148.10
20.83	$3.24 \pm 9.53 \times 10^{-2}$	+105.06
27.78	$3.64 \pm 4.37 \times 10^{-2}$	+130.38

赤拟谷盗抗性品系幼虫在磷化氢 5 个梯度浓度下熏蒸 24 h 后，虫体内的羧酸酯酶的活力见表 3。从中可以看出，与未熏蒸的抗性品系体内羧酸酯酶比活力相比，抗性品系受熏蒸后羧酸酯酶的活力分别增加了 99.37%、37.97%、148.10%、105.06% 和 130.38%。意味着赤拟谷盗抗性品系与敏感品系相比，磷化氢处理后，抗性品系的羧酸酯酶的活性增高了，但羧酸酯酶的活性增高的程度与试验中的磷化氢增减变化也不一致。

2.3.2 不同熏蒸时间对羧酸酯酶活力的影响 在磷化氢有效成分为 6.94×10^{-2} mg/L 的条件下，进行不同熏蒸时间后赤拟谷盗敏感和抗性品系的羧酸酯酶比活力测定，结果见图 2。从图 2 可以看出，同样磷化氢浓度下随着熏蒸时间的延长，抗性品系和敏感品系羧酸酯酶比活力有着不同的变化趋势。敏感品系在分别熏蒸 12、48、72 和 120 h 后，羧酸酯酶比活力按 μmol·min^{-1}·mg^{-1}protein 计算，分别为 0.58、0.63、0.38 和 0.21，与不熏蒸的对照相比，分别下降了 49.57%、45.22%、66.96% 和 81.74%。羧酸酯酶活性随着磷化氢熏蒸时间的延长逐渐降低，表明磷化氢对害虫的抑制作用随着熏蒸时间的增加而逐渐增强。

赤拟谷盗抗性品系在熏蒸 12、48、72 和 120 h 后，体内羧酸酯酶比活力按 μmol·min^{-1}·mg^{-1}protein 计算，分别为 2.21、2.61、2.68 和 2.82，与未熏蒸的相比，分别增加了 39.87%、65.19%、69.62% 和 78.48%，且随着磷化氢熏蒸时间的延长，羧酸酯酶活性相应增加。

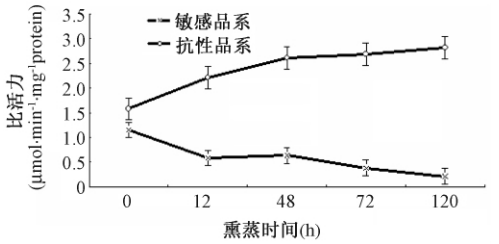

图 2　6.94 × 10⁻² mg/L 磷化氢浓度不同熏蒸时间后赤拟谷盗幼虫 CarE 比活力

3　讨论

3.1　磷化氢熏蒸对赤拟谷盗羧酸酯酶的影响

本研究结果显示,对于赤拟谷盗的磷化氢敏感品系,在 24 h 的熏蒸后磷化氢熏蒸抑制了其体内的羧酸酯酶活性。而对于赤拟谷盗的磷化氢抗性品系,熏蒸后虫体内的羧酸酯酶活性非但未受到抑制,反而有所增加。一般来说,虫体内解毒酶的活性增强可能与对杀虫剂的抗性有关。赤拟谷盗对磷化氢的抗性与羧酸酯酶活性的相关性值得进一步探讨。

3.2　赤拟谷盗磷化氢敏感和抗性品系间体内羧酸酯酶的差异

关于农业昆虫的羧酸酯酶与有机磷和拟除虫菊酯类杀虫剂抗药性关系的研究已有很多报道。许多研究证实,昆虫对这些杀虫剂具有抗性的品系中羧酸酯酶活性明显有所提高[9~11]。谢尊逸等在对不同磷化氢抗性米象成虫的研究中报道,抗性品系比敏感品系的羧酸酯酶的活力高 27.5%,但其所用 2 个米象品系差异较小(抗性系数 $Rf = 55.62$)[12]。本研究得到了赤拟谷盗抗性品系不论是幼虫还是蛹,虫体内羧酸酯酶活性都大于敏感品系,两品系间个体羧酸酯酶比活力分布频率的结果也与之一致。结果显示,赤拟谷盗羧酸酯酶比活力的变化可能与磷化氢抗性有一定关系,即可能存在羧酸酯酶对磷化氢的解毒作用。

3.3　赤拟谷盗磷化氢抗性与敏感品系中羧酸酯酶活性的变化

昆虫体内羧酸酯酶的活性增强,意味着它对外源化合物的解毒代谢作用的增强,这可能会导致昆虫对这些杀虫药剂产生抗药性。抗性和敏感品系个体间羧酸酯酶活性差异的显著存在,一种情况是抗性昆虫的羧酸酯酶分子可因发生变构而具有更大的解毒能力,而抗性品系和敏感品系之间的酶量还是相同的;另一种情况是抗性个体比敏感个体合成更多的酶,从而增加解毒能力,或者合成更多的酶蛋白增加与杀虫剂酯的结合能力[2]。但在昆虫的羧酸酯酶活性与有机磷和拟除虫菊酯杀虫剂的抗药性关系也存在相反的报道。Van Asperen 等发现对马拉硫磷、对氧磷和对硫磷产生抗性的家蝇品系中羧酸酯酶(脂族酯酶)活性低于敏感品系,并提出了“脂族酯酶突变理论”[13]。在对有机磷杀虫剂产生抗性的印度粉蛾中发现了类似的现象[14]。随后研究发现抗性铜绿蝇羧酸酯酶发生了 5 个氨基酸的突变,利用定点突变及体外表达的方法证明 Gly137→Asp 的突变是导致抗性的原因[15]。孙鲁娟等也曾报道,以 α-NA 为底物测定时氧化乐果敏感品系棉蚜羧酸酯酶的比活力显著高于抗性品系棉蚜。报道中指出已经对氧化乐果产生抗性的棉蚜体内的羧酸酯酶发生了突变,即羧酸酯酶对其标准底物的水解活性降低了[16]。

本研究中赤拟谷盗抗性品系的羧酸酯酶比活力比敏感品系高 15.91%,以及磷化氢熏蒸处理对敏感和抗性品系的羧酸酯酶活性存在不同影响的结果,可初步判断赤拟谷盗磷化氢抗性和敏感品系的羧酸酯酶可能存在结构上的差异,这当然还需要进一步的研究验证。

致　谢　本研究主要在中国农业大学国家“211 工程”昆虫生理生态学重点实验室昆虫生理生化与毒理学研究室进行,期间得到了该研究室许多老师和同学的帮助和支持,在此谨致谢。

参　考　文　献

1　Lien T. J., John E. C. Insect pyrethroid-hydrolyzing esterases. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1974, **4**(4): 465 ~ 472.

2 唐振华. 昆虫抗药性及其治理. 北京:中国农业出版社, 1993. 220 ~ 234.

3 郑炳宗, 高希武,王政国,等. 北京及河北北部地区瓜-棉蚜对拟除虫菊酯抗性的初步研究. 植物保护学报,1988, **15**(1):55 ~ 61.

4 郑炳宗,高希武,王政国,等. 瓜-棉蚜对有机磷及氨基甲酸酯杀虫剂抗性机制研究. 植物保护学报,1989,**16**(2):131 ~ 137.

5 王殿轩,曹阳. 磷化氢熏蒸杀虫技术. 成都:成都科技大学出版社, 1999.

6 FAO. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some major pest species of stored cereal with methyl bromide and phosphine. FAO Method No16. *FAO Plant Protection Bulletin*,1975, **23**:12 ~ 25.

7 Van Aspern K. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 1962, **8**(3):401 ~ 416.

8 Bradford T. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 1976. **72**(1 ~ 2):248 ~ 254.

9 李飞, 韩召军,唐波. 抗性品系棉蚜乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶的变异. 昆虫学报,2003,**46**(5):578 ~ 583 .

10 邱立红,张文吉. 不同抗性水平家蝇对有机磷、拟除虫菊酯等药剂的交互抗性的研究. 中国农业大学学报,1999,**4**(1):86 ~ 92.

11 孙耘芹, 袁家, 李晶,等. 家蝇对拟除虫菊酯农药的抗性机制. 昆虫学报,1990,**33**(3):265 ~ 273.

12 谢尊逸, 贾宝琦,何凤琴. 米象对磷化氢抗性机理的初步研究. 粮食储藏,1986,**15**(4):1 ~ 7.

13 Van Asperen K. Oppenoorth F. J. Organophosphate resistance and esterase acitity in houseflies. *Entom. Exp. Appl.*, 1959, **2**(11):48 ~ 57.

14 Beeman R. W., Schmidt B A. l. Biochemical and genetic aspects of malathion-specific resistance in the Indian meal moth. *J. Econ. Entomol.*, 1982,**75**(3): 945 ~ 949.

15 Newcomb R. D. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Genetics*, 1997, **94**(14): 7 464 ~ 7 468.

16 孙鲁娟,高希武,郑炳宗. 棉蚜抗氧化乐果品系及敏感品系羧酸酯酶性质的比较研究. 昆虫学报,2002,**45**(6):724 ~ 727.