

中华稻蝗等位酶基因型对杀虫剂氯氟氰菊酯致死性的响应

李翠兰¹, 段毅豪², 卢芙萍¹, 郭亚平¹, 马恩波¹

(1. 山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006; 2. 山西大学环境与资源学院, 山西 太原 030006)

摘要:用氯氟氰菊酯($0.53\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)注射中华稻蝗, 研究比较了在 Ldh、Gpi 和 Pgm 基因座位上各基因型个体的死亡率差异, 列联表进行 χ^2 检验。结果表明, 氯氟氰菊酯对 Ldh 和 Gpi 各基因型个体的选择呈现随机特征, 各基因型与死亡率未见显著的相关($P > 0.05$)。但在 Pgm 基因座位上, 各基因型个体的死亡率分别为 24% (Pgm - AB), 48% (Pgm - BB), 48% (Pgm - BC), 52% (Pgm - CC) 和 62% (Pgm - AA)。且 Pgm - AB 与 Pgm - AA, Pgm - BB, Pgm - BC, Pgm - CC 之间的基因型与死亡率存在显著相关关系($P < 0.05$)。以上结果表明本中华稻蝗种群中 Pgm - AB 基因型很可能与氯氟氰菊酯的抗药性有关。

关键词:中华稻蝗; 氯氟氰菊酯; 等位酶; 基因型; 死亡率

中图分类号:S481.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1672 - 2043(2004)03 - 0444 - 04

Lethal Responses of Allozyme Genotypes of Oxya Chinensis Towards Cyhalothrin

LI Cui-lan¹, DUAN Yi-hao², LU Fu-ping¹, GUO Ya-ping¹, MA En-bo¹

(1. Collage of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Collage of Environmental Science and Resources, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Outbreaks of swarming grasshopper *Oxya chinensis* in China have been increasing in recent ten years. A population of the species from Jinyuan District, Taiyuan, China were found to be polymorphic loci at Ldh, Gpi and Pgm using horizontal starch gel electrophoresis, with the mean number of alleles per locus of 3.3 and the observed mean heterozygosities of 0.375 ~ 0.376, respectively. This relatively high polymorphism made it possible for allozyme analysis for exploring the possible mortality difference among the individuals of various genotypes acutely exposed to cyhalothrin, an insecticide commonly used for grasshopper control. A total of 551 *O. chinensis* individuals from this population were injected with cyhalothrin ($0.53\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) to abdomen to achieve a mortality of 47.2% after 48 hours. The allozyme analysis was then employed to determine the number of each genotype for both surviving and dead individuals. The differential mortality among the allozyme genotypes of *O. chinensis* was compared between surviving and dead groups of the grasshopper. At the loci of Ldh and Gpi, cyhalothrin displayed random lethal effects on each genotype, and no correlation between the genotype and lethality was observed ($P > 0.05$). However, the differential selective effects on the genotypes were observed at Pgm locus. It was found that the mortality among the individuals varied depending on genotype, i. e. 62% (Pgm - AA), 24% (Pgm - AB), 48% (Pgm - BB), 48% (Pgm - BC) and 52% (Pgm - CC), respectively. Contingency table χ^2 tests showed the significant genotypic effects on the surviving and dead groups in the following genotype pairs: Pgm - AB vs. Pgm - AA, Pgm - AB vs. Pgm - BB, Pgm - AB vs. Pgm - BC, Pgm - AB vs. Pgm - CC. Under the scenarios of 1) the presence of uniform biological characters other than Pgm genotypes, and 2) the presence of allelic interaction and heterozygote vigor for Pgm - A and Pgm - B, it is expected that the mortality of Pgm - AB to be significantly different from those of Pgm - AA and Pgm - BB, assuming no significant difference existing in the latter two homozygotes. The data obtained in this study were found consistent with such reasoning, which suggested certain correlation of Pgm - AB genotype to the grasshopper species' resistance to the pesticide cyhalothrin. The data imply that the increased Pgm - AB genotype and perhaps Pgm - B allele frequency in a population may be useful as the potential resistant biomarker to pesticide cyhalothrin. This preliminary results calls for more scrutinizing through the integration of other molecular markers and detailed toxicological studies on the cyhalothrin mechanisms, along with ecological characteristics of the population before the deterministic relationship of the population's genetic background and pesticide resistance can be made.

Keywords: *Oxya chinensis*; cyhalothrin; allozyme; genotype; mortality

收稿日期: 2004 - 02 - 18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170612, 20177012); 山西省留学基金资助项目

作者简介: 李翠兰(1962—), 女, 博士研究生, 研究方向为遗传毒理学。

联系人: 马恩波, E-mail: maenbo2003@sxu.edu.cn

氯氟氰菊酯 (Cyhalothrin) 属拟除虫菊酯类农药, 其分子结构较复杂, 毒理机制尚不完全明确, 抑制昆虫中枢神经系统 Na^+ - 通道是其击倒和杀死昆虫的主要机制之一^[1]。氯氟氰菊酯是一种高效低毒杀虫剂, 具有触杀和胃毒作用, 杀菌谱广, 能有效防治多种农业害虫 (包括鳞翅目、半翅目、鞘翅目、双翅目、直翅目) 和卫生害虫^[2, 3]。但在害虫常发或多发地区, 长时间高剂量使用该类杀虫剂很容易产生抗性^[4, 5]。由于害虫遗传学理论尚不完善和缺乏抗性基因频率等新技术的研究, 致使对害虫抗性机理的研究多局限在生理生化方面。按照现代遗传学理论, 抗性的发生几乎都是遗传与环境因素 (包括天然的和人为的) 相互作用的结果^[4], 对某种害虫而言, 其对农药的抗性程度取决于该害虫种群的遗传结构特征^[6]。所以利用种群遗传结构动态变化作为害虫对农药抗性的监测指标和评估依据是一条新的思路。等位酶分析技术起初主要用于种群遗传多样性和物种进化研究^[7, 8], 20 世纪 90 年代以后, 等位酶技术和种群遗传计算开始在毒理学中获得应用。大量研究表明, 环境污染物可导致水生生物自然种群和实验室种群等位酶基因型频率的改变^[9~11], 但杀虫剂对农业害虫选择作用的研究尚不多见。

中华稻蝗 (*Oxya chinensis*) 是中国重要的农业害虫之一, 除新疆、西藏等少数省区外, 我国的大多数地区均有分布, 主要危害水稻和其他禾本科作物, 且种群密度大, 在我国其危害程度呈现逐年上升趋势^[12, 13]。本文以重要农业害虫——中华稻蝗 (*O. chinensis*) 为研究对象, 探索中华稻蝗等位酶基因型与杀虫剂氯氟氰菊酯急性致死作用之间的相关关系, 以便为中华稻蝗的化学防治提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及农药

中华稻蝗采自山西省太原市晋源区 (E112°36', N37°46'), 室内适应性饲养 2 d 后, 选择健壮、大小均匀的 5 龄若虫进行急性毒性试验。供试农药: 氯氟氰菊酯 (Cyhalothrin), 2.5% 乳油, 商品名: 功夫, 由捷利康南通农用化学品有限公司生产。

1.2 急性致死处理

根据本实验室所测得的氯氟氰菊酯对中华稻蝗的 LD_{50} 值, 将氯氟氰菊酯农药药剂用蒸馏水稀释 700 倍 (终浓度为 $0.036 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 用微量注射器按 $0.53 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 (注射体积为 $4 \mu\text{L} \cdot \text{头}^{-1}$) 由腹部第一

和第二体节间注入五龄若虫的体腔中。共处理试虫 551 头 (试虫体重 $0.27 \text{ g} \pm 0.041 \text{ g}$), 注射后 48 h 检查死亡率, 死亡标准以探针轻触虫体, 无明显反应者为死亡。死亡个体与存活个体分别保存于 -80°C 冰箱内备用。

1.3 等位酶电泳

根据本实验室以往研究结果^[14], 对有多态性的乳酸脱氢酶 (LDH)、6-磷酸葡萄糖异构酶 (GPI) 和磷酸葡萄糖变位酶 (PGM) 进行等位酶分析。分析方法采用水平切片淀粉凝胶电泳技术^[7, 8], 淀粉凝胶浓度为 12.5%, 电泳缓冲液为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH8.0), 电泳缓冲液与凝胶缓冲液之比为 9:1。

取每个个体的后足股节肌肉, 置于 $20 \mu\text{L}$ 双蒸水内匀浆 (冰浴下), 浸入 $3 \text{ mm} \times 9 \text{ mm}$ 滤纸芯作为上样品。然后在 4°C 冰柜内恒压 ($11 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$) 电泳 5 h, 水平切片后用特异性染色方法进行染色^[7, 8]。酶谱判读时, 同一基因座位泳动最快的带记为 A, 以后依次记为 B、C 等。

1.4 统计分析

1.4.1 种群遗传结构分析

将存活个体和死亡个体分别计数, 其和即为总个体数 (初始样本)。使用 BIOSYS - II^[5] 软件计算 3 个样本的等位基因频率、哈-温 (H-W) 平衡适合度、观察杂合度 (H)、固定指数 (F)、多态位点百分率 (P) 和平均杂合度。

1.4.2 基因型与死亡率之间的相关性检验

对中华稻蝗多态基因座位的各基因型与死亡率进行 2×2 列联表 χ^2 检验, 以了解基因型与氯氟氰菊酯急性致死作用之间的相关性。各多态基因座位上的每个基因型为一组, 每组的个体数即为重复数。各多态基因座位上存活或死亡数少于 5 的基因型不计。

2 结果

2.1 中华稻蝗初始样本、氯氟氰菊酯处理后存活组和死亡组的遗传结构分析

中华稻蝗初始样本、氯氟氰菊酯处理后存活组和死亡组的等位基因频率、哈-温 (H-W) 平衡适合度、观察杂合度 (H) 和固定指数 (F) 见表 1。在 Ldh、Gpi 和 Pgm 3 个基因座位上, 酶谱清晰的初始样本分别有 530, 527, 551 头, 表明 Ldh 和 Gpi 基因座位上分别有 21 头和 24 头若虫由于某中原因无电泳酶谱。酶谱判

结果表明, 本文研究的中华稻蝗种群中, Ldh、Gpi 和 Pgm 均为多态基因座位, 其中 Ldh 存在 2 个等位基因, 而 Gpi 存在 3 个等位基因, Pgm 有 3 个等位基因, 但以 Pgm - B 基因占优势。且 Ldh 的基因型频率符合哈 - 温 (H - W) 平衡预期值, 但 Gpi 和 Pgm 的基因型频率显著偏离哈 - 温平衡预期值, 见表 1。其中 Pgm 是由于杂合体缺乏, 而 Gpi 为杂合体过剩。中华稻蝗初始样本、氯氟氰菊酯处理后存活组和死亡组在 3 个基因座位上的种群遗传多样性见表 2。本实验种群的在这 3 个基因座位上的多态性程度较高, 体现在较高

表 1 中华稻蝗初始样本、氯氟氰菊酯处理后存活组和死亡组的等位基因频率、基因型频率的哈 - 温平衡预期值的卡方检验 (H - W)、观察杂合度 (H) 和固定指数 (F)

Table 1 Allele frequency, tests for Hardy - Weinberg (H - W) expectations, observed heterozygosity (H) and fixation index (F) in alive, dead and initial samples of *O. chinensis* after injection with cyhalothrin

基因座位	Ldh			Gpi			Pgm		
	存活组	死亡组	初始样本	存活组	死亡组	初始样本	存活组	死亡组	初始样本
N	(273)*	(257)	(530)	(274)	(253)	(527)	(291)	(260)	(551)
A	0.736	0.767	0.751	0.250	0.261	0.255	0.067	0.050	0.059
B	0.264	0.233	0.249	0.668	0.676	0.672	0.842	0.850	0.846
C				0.082	0.063	0.073	0.089	0.098	0.093
D							0.002	0.002	0.002
H - W ^b	2.330	0.103	1.806	15.816*	16.483*	27.651**	73.748**	163.751**	201.482**
H ^c	0.425	0.366	0.396	0.500	0.530	0.514	0.182	0.123	0.154
F	-0.094	-0.022	-0.059	-0.032	-0.124	-0.075	0.346	0.536	0.434

注: a. 括号内的值为样本大小; b. 基因型频率的哈 - 温平衡预测值的卡方检验值 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$); c. 杂合度的直接观察值, 当最常见的等位基因频率小于 95% 时, 即为多态基因座位。

表 2 中华稻蝗初始样本、氯氟氰菊酯处理后存活组和死亡组在 3 个基因座位上的遗传多样性

Table 2 Genetic Variability at three loci in alive, dead and initial samples of *O. chinensis* after injection with cyhalothrin

样本	每个基因座位平均样本大小	每个基因座位平均等位基因数	平均杂合度	
			直接观察值	哈 - 温平衡预期值*
存活组	274.5(6.4)	3.3(0.5)	0.375(0.068)	0.440(0.070)
死亡组	256.8(1.4)	3.3(0.5)	0.376(0.091)	0.431(0.078)
初始样本	513.3(7.1)	3.3(0.5)	0.376(0.078)	0.436(0.074)

注: 括号内的值为标准误差; * 无偏差估计 (Nei, 1978)。

的每个基因座位的平均等位基因数(3.3)和观察平均杂合度(0.375 ~ 0.376), 适合于作不同基因型间死亡率差异比较。

2.2 中华稻蝗等位酶基因型与杀虫剂氯氟氰菊酯致死作用的关系

中华稻蝗五龄若虫注射氯氟氰菊酯后, 平均死亡率为 47.2% (260/551), Ldh、Gpi 和 Pgm 基因座位上各基因型个体的死亡率及各基因型与死亡率的 2 × 2 列联表 χ^2 检验结果见表 3。

检验结果表明, 经氯氟氰菊酯处理后, 中华稻蝗在 Ldh 和 Gpi 各基因型个体的死亡率无显著差异 ($P > 0.05$), 显示氯氟氰菊酯的致死作用对 Ldh 和 Gpi 基因型的选择是随机的; 但 Pgm 各基因型个体的死亡率分别为 24% (Pgm - AB), 48% (Pgm - BB), 48% (Pgm - BC), 52% (Pgm - CC) 和 62% (Pgm -

表 3 氯氟氰菊酯处理后中华稻蝗 3 个基因座位不同基因型个体的死亡率比较

Table 3 Comparison of the mortalities of the individuals with different genotypes at threepolymorphic loci of *O. chinensis* after injection with cyhalothrin

等位酶基因型	3 个多态基因座位各基因型个体的死亡率		
	Ldh	Gpi	Pgm
AA	0.51(293)*	0.38(34)	0.62(13)b
AB	0.45(210)	0.53(200)	0.24(34)a
BB	0.48(27)	0.47(219)	0.48(426)b
BC		0.40(70)	0.48(44)b
CC			0.52(27)b

注: * 括号内的值为样本大小。标有完全不同字母的死亡率之间有显著差异, 如 a 和 b 之间有显著差异 ($P < 0.05$); 而 a (或 b) 与 ab 之间无显著差异 ($P > 0.05$)。

AA) (表 3), 且 Pgm - AB 与 Pgm - AA, Pgm - AB 与

Pgm - BB、Pgm - AB 与 Pgm - BC、Pgm - AB 与 Pgm - CC 在基因型和死亡率之间存在显著相关关系 ($P < 0.05$), 表明氯氟氰菊酯的致死作用对 Pgm 基因座位的不同基因型呈现出非随机特征。

3 讨论

近年来由于长期使用拟除虫菊酯类农药防治害虫, 许多害虫对其产生抗性而使防治失败。害虫对杀虫剂的抗性主要是由于在杀虫剂的定向选择作用下, 害虫群体中抗性基因或基因型频率增加的缘故^[4, 5]。因此, 有必要研究害虫对拟除虫菊酯类农药抗性的发生发展规律, 以便监测抗性动态变化和确定抗性水平及其分布, 从而延长对环境安全性农药——拟除虫菊酯类的使用寿命。等位酶分析方法为这方面的研究工作提供了一种较为可行的方法。本文研究结果表明: (1) 中华稻蝗种群 3 种等位酶 (Ldh, Gpi, Pgm) 具有高的多态性和杂合性, 可用于氯氟氰菊酯等农药对具有不同基因型个体致死性差异的探索研究; (2) 中华稻蝗种群 3 种等位酶 (Ldh, Gpi, Pgm) 各基因型对氯氟氰菊酯的致死作用具有不同响应 (response), 即在氯氟氰菊酯的急性致死作用下, Ldh 和 Gpi 各基因型个体的死亡率没有明显差异, 而 Pgm 各基因型个体的死亡率在 24% (Pgm - AB) 和 62% (Pgm - AA) 之间, 且 Pgm - AB 基因型个体的死亡率显著低于 Pgm - AA、Pgm - BB、Pgm - BC 和 Pgm - CC 基因型个体的死亡率。进一步对 Pgm - A 和 Pgm - B 基因进行分析, 假设①除 Pgm 基因型外, 本中华稻蝗种群的其它生物学性状相同; ② Pgm - A 和 Pgm - B 等位基因存在相互作用, 并表现出杂种优势, 则在 Pgm - AA 和 Pgm - BB 个体的死亡率没有显著差异的情况下, 具有 Pgm - AB 基因型个体的死亡率应该低于 Pgm - AA 和 Pgm - BB 个体的死亡率, 并与 Pgm - AA 和 Pgm - BB 个体的死亡率存在显著差异, 以上推论与本试验数据吻合。这些结果表明本中华稻蝗种群中 Pgm - AB 基因型很可能与氯氟氰菊酯的抗性有相关关系。但是, 这种相关关系不应等同为因果关系。氯氟氰菊酯的毒性及抗性机理又非常复杂, 可能是神经敏感性降低、多功能氧化酶和酯酶活性增加、表面穿透性降低等几个因子综合作用的结果^[16]。一般认为,

等位酶分析技术可能作为潜在的、与抗性有关的遗传标记^[9-11], 进一步的工作应结合其他遗传标记结果和种群生态特征, 并进行基因分析, 结合宏观和微观两方面研究, 探究更为确切的种群遗传结构和种群抗性进化之间的关系。

参考文献:

- [1] 张宗炳, 冷欣夫. 杀虫药剂毒理及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1993.
- [2] 惠玉虎译. 新型的拟除虫菊酯类杀虫剂[J]. 农药译丛, 1989, 11 (2): 10 - 15.
- [3] 冯 坚. 具有光学活性的拟除虫菊酯杀虫剂开发概况[J]. 农药, 2000, 39(2): 1 - 6.
- [4] 唐振华, 吴士雄. 昆虫抗药性的遗传与进化[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000. 99 - 323.
- [5] Roush R T, Tabashnik B E. 主编. 芮昌辉, 等译. 害虫的抗药性[M]. 北京: 化学工业出版社, 1995.
- [6] Guedes R N C, Kambhampati S, Dover B A. Allozyme variation among Brazilian and U. S. populations of *Rhyzopertha dominica* resistant to insecticides[J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1997, 84: 49 - 57.
- [7] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] Hillis D M, Moritz C, Mable B K. Molecular systematics (2nd, edition) [M]. USA: Sinauer Associaye, Inc. Publisher, 1996, 45 - 126.
- [9] Schlueter M A, Guttman S I, Oris J T, et al. Survival of copper - expose juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) differs among allozyme genotypes[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1995, 14 (10): 1727 - 1734.
- [10] Duan Y H, Guttman S I, Oris J T, et al. Genotype and toxicity relationships among *Hyalella azteca*: IAcute exposure to metals or low pH [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2000, 19(5): 1414 - 1421.
- [11] Gillespie R B, Guttman S I. Correlations between water quality and frequencies of allozyme genotypes in Spotfin Shiner (*Notropis spilopteris*) Populations[J]. *Environ Pollut*, 1993, 81: 147 - 150.
- [12] 冯祥和, 牛泽民. 中华稻蝗在水稻上危害损失及防治指标研究的商榷[J]. 昆虫知识, 1994, 31(4): 198 - 200.
- [13] 皖 石, 王德民. 中华稻蝗的发生与综合防治[J]. 中国农村科技, 2002, 9: 22 - 23.
- [14] 李春选, 段毅豪, 郑先云, 等. 中国 4 种蝗虫不同种群的遗传分化[J]. 遗传学报, 2003, 30(3): 234 - 244.
- [15] Swofford D L, Selander R B. BIOSYS - 1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics[J]. *J Hered*, 1981, 72: 419 - 426.
- [16] 冷欣夫, 邱星辉. 我国昆虫毒理学五十年来研究进展[J]. 昆虫知识, 2000, 37(1): 24 - 28.