

敌百虫对中华稻蝗磷酸葡萄糖异构酶基因型的致死性差异研究

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: 采用急性致死处理及等位酶电泳分析方法, 研究比较了敌百虫处理后中华稻蝗 Gpi、Ldh 和 Pgm 各基因型频率在存活组与死亡组之间的差异。结果表明, 敌百虫对中华稻蝗 3 种多态酶基因座位不同的基因型表现出不同的选择性致死作用, 其中敌百虫对 Ldh 和 Pgm 各基因型的选择呈现随机特征, 死亡组和存活组各基因型分布没有显著关联 ($P > 0.05$); 而敌百虫对 Gpi 各基因型的选择呈现出非随机效应, 在 Gpi 基因座位上, 具有不同基因型个体的死亡率分别为 Gpi – AA (47%), Gpi – AB (58%), Gpi – BB (56%) 和 Gpi – BC (18%)。 χ^2 独立性检验表明, Gpi – BC 与其他 3 个基因型在存活组和死亡组之间存在显著关联 ($P < 0.05$)。以上结果表明本中华稻蝗种群 Gpi – BC 基因型很可能与敌百虫的抗性有关。

关键词: 死亡率; 中华稻蝗; 敌百虫; 等位酶; 基因型

中图分类号: Q355 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 – 2043(2004)02 – 0381 – 03

Mortality Differences among the *Oxya chinensis* Genotypes at Glucose – 6 – phosphate Isomerase by Trichlorphon

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: The mortality differences among the allozyme genotypes of *Oxya chinensis* were compared between surviving and dead groups of the grasshopper after 24 hours of injection with pesticide trichlorphon. The differently selective effects on genotypes were observed at three polymorphic loci (Gpi, Ldh, Pgm). At the loci of Ldh and Pgm, trichlorphon displayed random lethal effects on each genotype, with no significant correlation between the genotype and lethality. However, at Gpi locus the mortality of the individuals varied depending on genotype, i. e. 47% (Gpi – AA), 58% (Gpi – AB), 56% (Gpi – BB) and 18% (Gpi – BC) respectively. Chi – square independence tests demonstrated significant genotypic effects on the survivorship among the genotype pairs of: Gpi – BC vs. Gpi – AA, Gpi – BC vs. Gpi – AB, Gpi – BC vs. Gpi – BB. These data suggested that Gpi – BC genotype of *O. chinensis* related to the resistance to the pesticide trichlorphon.

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

敌百虫 (trichlorphon) 属有机磷农药, 对害虫具有胃毒、触杀和熏蒸等作用, 是一种高效、低毒、低残留的杀虫剂, 能有效防治多种农业和卫生害虫及动物寄生虫。近年来, 由于有机磷农药的长期应用, 害虫的

抗药性逐步提高^[1]。一般认为, 杀虫剂抗性是一种生物进化现象, 是昆虫种群内部遗传结构在杀虫剂的选择作用下持续变化的结果^[2]。因此, 有必要研究害虫种群遗传结构的动态变化, 为开发抗药性检测新方法 & 选择抗性治理方案提供基础数据。本文以重要农业害虫中华稻蝗 (*Oxya chinensis*) 为研究对象, 通过了解中华稻蝗等位酶基因型与敌百虫致死性之间是否存在相关关系, 探索中华稻蝗种群等位酶基因型作为杀

收稿日期: 2003 – 09 – 26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170612); 山西省自然科学基金资助项目 (991096, 20001022)

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: maenbo@public.ty.sx.cn

虫剂抗性生物标记物 (biomarker) 的可能性。

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'), 采集时间为 2002 年 8 月。室内饲养 2 d 后, 选择健壮、大小均匀的五龄若虫进行急性致死处理。供试农药为 90% 敌百虫 (trichlorphon) 原药粉剂, 为江苏安邦电化有限公司出品。

1.2 急性致死处理

根据王保成等^[3]对敌百虫的 LD₅₀ 检测结果, 将敌百虫原药粉剂用双蒸水稀释至 0.355%, 用微量注射器按 $5.3 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (4 μL) 药液注入中华稻蝗五龄若虫腹部第一和第二体节的体腔中, 共处理试虫 408 头 (试虫体重 $0.27 \pm 0.036 \text{ g}$), 注射后 24 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 ℃ 冰箱内备用。

1.3 等位酶电泳

对葡萄糖-6-磷酸异构酶 (GPI)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和磷酸葡萄糖变位酶 (PGM) 三种等位酶进行电泳分析, 实验试剂及方法见参考文献[4,5]。淀粉凝胶浓度为 12.5%, 电泳缓冲液为 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (0.05 mol · L⁻¹, pH8.0)。

1.4 数据处理

将存活个体和死亡个体分别计数, 其和为总个体

数(即初始样本)。用 BIOSYS - II^[5]软件计算 3 个样本的等位基因频率。并对敌百虫处理后存活组和死亡组的各基因型频率进行 $2 \times 2 \chi^2$ 独立性检验, 以了解等位酶基因型频率与敌百虫致死效果之间是否显著关联。各多态酶基因座位上存活或死亡数少于 5 的稀有基因型不进行统计分析。

2 结果

2.1 敌百虫处理后中华稻蝗的遗传结构分析

中华稻蝗 Gpi、Ldh 和 Pgm 基因座位等位酶图谱见图 1, 中华稻蝗初始样本及敌百虫处理后存活组与死亡组的等位基因频率见表 1。本中华稻蝗种群中 Gpi、Ldh 和 Pgm 均为多态基因座位, 其中 Gpi 存在 3 个等位基因, Ldh 存在 2 个等位基因, Pgm 存在 4 个等位基因。中华稻蝗初始样本及敌百虫处理后存活组与死亡组在 3 个基因座位的种群遗传度量值见表 2。

2.2 敌百虫处理后中华稻蝗各多态基因座位基因型频率与敌百虫致死率的关系

用敌百虫处理五龄若虫共 408 头, 注射后 24 h 平均死亡率为 52.7% (215/408), Gpi、Ldh 和 Pgm 基因座位上各基因型的死亡率及各基因型频率在存活组与死亡组之间的 χ^2 独立性检验结果见表 3。

χ^2 独立性检验结果表明, 经敌百虫处理后的中华稻蝗, 在 Ldh 和 Pgm 2 个多态基因座位上, 存活组和死亡组各基因型频率无显著差异 ($P > 0.05$), 显示敌百虫的致死性与 Ldh 和 Pgm 基因型没有显著关

表 1 敌百虫处理后中华稻蝗 3 个样本在 Gpi、Ldh 和 Pgm 基因座位的等位基因频率

Table 1 Allele frequency at three loci in alive, dead and initial samples of Oxya chinensis after treatment with trichlorphon

基因座位	Gpi			Ldh			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
样本量(N)	(193) ^a	(215)	(408)	(193)	(215)	(408)	(193)	(215)	(408)
A	0.189	0.214	0.202	0.758	0.771	0.765	0.041	0.058	0.050
B	0.733	0.772	0.754	0.242	0.229	0.235	0.866	0.854	0.859
C	0.078	0.014	0.044				0.088	0.086	0.087
D							0.005	0.002	0.004

注: a. 括号内的值为样本数目。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 敌百虫处理后中华稻蝗 3 个样本的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity at three loci in alive, dead and initial samples of Oxya chinensis after treatment with trichlorphon

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	193.0 (0.0)	3.3 (0.7)	0.307 (0.084)	0.345 (0.054)
死亡组	215.0 (0.0)	3.0 (0.6)	0.320 (0.050)	0.325 (0.032)
初始样本	408.0 (0.0)	3.3 (0.7)	0.314 (0.066)	0.335 (0.042)

注: 括号内的值为标准误差; * 无偏差估计 (Nei, 1978)。

表 3 中华稻蝗 3 个基因座位各基因型对敌百虫致死率的影响
Table 3 Genotype effects on lethality of trichlorphon in three polymorphic loci of *Oxya chinensis*

等位酶基因型	3 个多态基因座位各基因型的死亡率		
	<i>Gpi</i>	<i>Ldh</i>	<i>Pgm</i>
AA	0. 47 (7/15) * a	0. 52 (128/244)	0. 60 (3/5) **
AB	0. 58 (78/135) a	0. 54 (74/136)	0. 62 (16/26)
AC			0. 60 (3/5) **
BB	0. 56 (124/222) a	0. 43 (12/28)	0. 51 (161/314)
BC	0. 18 (6/34) b		0. 61 (28/46)
CC	0. 00 (0/2) **		0. 30 (3/10) **

注：* 括号内的值为死亡个体数目与初始样本个体数目之比；
** 观察值小于 5，不进行统计分析；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；而 a (或 b) 与 ab 之间无显著
差异 ($P < 0.05$)。

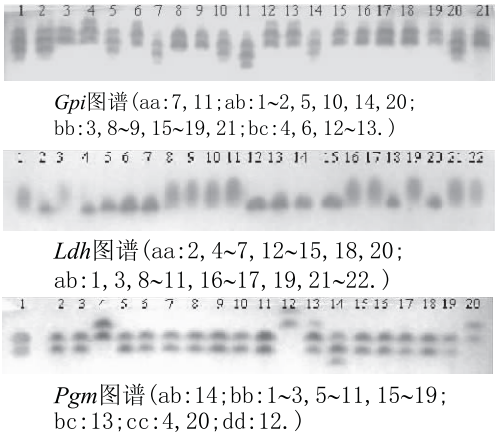


图 1 中华稻蝗 *Gpi*, *Ldh* 和 *Pgm* 基因座位等位酶图谱
Figure 1 The allozyme zymogram figures at three loci
(*Gpi*, *Ldh* and *Pgm*) of *Oxya chinensis*

联。但在 *Gpi* 基因座位上，具有不同基因型个体的死亡率存在差异，分别为 47% (*Gpi* - AA)，58% (*Gpi* - AB)，56% (*Gpi* - BB) 和 18% (*Gpi* - BC)，且 *Gpi* - BC 与 *Gpi* - AA，*Gpi* - BC 与 *Gpi*AB，*Gpi* - BC 与 *Gpi* - BB 基因型频率在存活组和死亡组之间存在显著关联 ($P < 0.05$)。表明敌百虫的致死性对 *Gpi* 基因座位的不同等位基因型呈现出非随机特征。

3 讨论

自然选择学派认为，害虫对杀虫剂的抗药性是由于在杀虫剂的定向选择作用下，害虫群体中与抗性有关的基因或基因型频率增加的缘故。实验室研究是探讨害虫对有机磷农药抗性的发生发展规律的第一步，其结果可用来监测抗性动态变化和确定抗性水平及其分布，从而延长对有机磷农药的使用寿命。本文研

究结果表明，中华稻蝗是研究酶多态性与环境因子、特别是人为环境因子 (如农药) 关系的理想生物物种，原因如下：①中华稻蝗广泛分布于俄罗斯远东地区以及几乎整个东洋界，且种群密度大，在我国主要危害水稻和其他禾本科作物，其危害程度呈现逐年上升趋势^[7,8]。②中华稻蝗种群分化明显，特别是几种等位酶 (包括 *Gpi*, *Ldh*, *Pgm*) 具有很高的多态性 (polymorphism)^[9]，为研究农药对具有不同基因型个体的致死性差异提供了可能性。③本研究观察到中华稻蝗种群 3 种等位酶 (*Gpi*, *Ldh*, *Pgm*) 基因型对敌百虫具有不同响应 (response)，表现为敌百虫对 *Ldh* 和 *Pgm* 2 个基因座位的所有基因型的致死性呈现随机特征，但对 *Gpi* 基因座位各基因型的致死性却呈现出非随机效应，具有 *Gpi* - BC 基因型个体的死亡率 (18%) 显著低于具有 *Gpi* - AA、*Gpi* - AB 和 *Gpi* - BB 基因型个体的死亡率 (47% ~ 58%)。以往研究表明，环境污染物可导致水生生物自然和实验室种群等位酶基因型频率的改变^[10,11]，但对农药选择作用的研究尚不多见。此关系的确立可使中华稻蝗种群遗传结构的动态变化作为敌百虫抗性的生物标记物 (biomarker)，或至少表明基因型频率与敌百虫致死性在统计学上存在相关关系，因此，这方面的研究应该成为农药分子生态学研究的一个方向。

参考文献：

[1] 冷欣夫, 邱星辉. 我国昆虫毒理学五十年来的研究进展[J]. 昆虫知识, 2000, 37(1): 24 - 28.
[2] 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. 283 - 323.
[3] 王保成, 马恩波, 任竹梅. 两种有机磷农药及混配农药的毒力测定[J]. 山西大学学报, 2000, 23(4): 354 - 357.
[4] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 77 - 139.
[5] Hillis D M, Moritz C, Mable B K. Molecular systematics[M] (2nd, edition). USA: Sinauer Associaye, Inc. Publisher, 1996. 45 - 126.
[6] Swofford D L, Selander R B. BIOSYS - 1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics[J]. Journal of Heredity, 1981, 72: 419 - 426.
[7] 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.
[8] 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.
[9] 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.
[10] Gillespie R B, Guttman S I. Correlations between water quality and frequencies of allozyme genotypes in Spotfin Shiner (Notropis spilopteris) Populations[J]. Environ Pollu, 1993, 81: 147 - 150.
[11] Duan Y H, Guttman S I, Oris J T et al. Differential survivorship among allozyme genotypes of Hyalella azteca exposed to cadmium, zinc or low pH[J]. Aquatic Toxicology, 2001, 54: 15 - 28.