

陈立华, 张月华, 钱荷英, 等. 蓖麻蚕对辛硫磷农药的代谢抗性机制[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 264–266.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.078

蓖麻蚕对辛硫磷农药的代谢抗性机制

陈立华^{1,2}, 张月华^{1,2}, 钱荷英², 孙平江², 李刚², 徐安英^{1,2}

(1. 江苏科技大学, 江苏镇江 212003; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018)

摘要:将 40% 辛硫磷原液稀释成 35 ~ 70 mg/L 浓度区间的 8 个浓度梯度, 采用浸叶法测定了辛硫磷对于 5 龄第 3 天蓖麻蚕 (*Philosamia cynthia ricini*) 24 h 的半致死浓度 (LC₅₀), 计算出 40% 辛硫磷乳油对蓖麻蚕的 LC₅₀ (24 h) 为 51.81 mg/L。用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测添食 50 mg/L 辛硫磷后蓖麻蚕乙酰胆碱酯酶基因 *Pcrace1*、*Pcrace2* 在不同组织 (血液、脂肪体、中肠、丝腺、头) 中的表达变化, 结果显示: 在添食辛硫磷之后, *Pcrace1*、*Pcrace2* 在各组织中的表达都有变化, 其中 *Pcrace1* 在头部、脂肪体的转录表达量分别比对照组高 10.66、26.50 倍; *Pcrace2* 在头部、脂肪体的转录表达量分别比对照组高 24.73、14.56 倍; *Pcrace1*、*Pcrace2* 表达量在中肠、丝腺中的变化不大, 上调的倍数分别是 7.65、5.62 与 3.44、2.34 倍; *Pcrace1*、*Pcrace2* 在血液中几乎无表达变化, 表达变化倍数分别为 2.52、1.11 倍。结果表明, *Pcrace1*、*Pcrace2* 主要在脂肪体、头部发挥代谢解毒作用, 而中肠、丝腺等组织对农药辛硫磷的代谢解毒作用较小, 血液几乎不参与解毒作用。

关键词:蓖麻蚕; 辛硫磷; 半致死浓度 (LC₅₀); 代谢解毒; 乙酰胆碱酯酶基因 (*ace*)

中图分类号: S885.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0264-03

蓖麻蚕 (*Philosamia cynthia ricini*) 原产于印度, 是大蚕蛾科柞蚕的一个亚种, 以蓖麻叶、椿树叶及木薯叶为主要饲料, 在我国广西、江苏、内蒙以及印度、泰国等东南亚国家进行饲养, 是绢丝生产的重要蚕品种之一^[1]。辛硫磷是一种以触杀、胃毒为主的高效低毒有机磷杀虫剂, 因其具有杀虫广谱性和无内吸作用, 广泛应用于小麦、玉米、水稻、棉花、桑树等作物的多种鳞翅目害虫的防治^[2]。但是在对木薯、蓖麻等作物害虫进行防治的过程中, 由于对药物浓度、残留期等把握不好, 蓖麻蚕农药中毒的情况时有发生, 导致蚕农养蚕绝收或蚕茧质量、产量下降, 蚕蚕户出现较大的经济损失, 成为蓖麻蚕产业发展的阻力^[3]。

乙酰胆碱酯酶^[4]是昆虫靶标抗性作用靶标之一, 为有机磷、氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标, 乙酰胆碱酯酶的突变^[5]和超表达^[6]是昆虫抵抗杀虫剂的重要方法, 国内外已有许多相关报道。王举梅等对家蚕添食辛硫磷前后 2 种乙酰胆碱酯酶基因 (*ace1*、*ace2*) 的转录特征进行了研究, 结果表明: 在正常的家蚕中, *ace1* 在各组织中表达量差异很大, 在脑组织中高量表达, 在其他所有组织中只有微弱的表达; 而 *ace2* 在各组织中的表达量差距不大, 在中肠、丝腺和血淋巴中相对表达量较低, 在脂肪体、卵巢中相对表达量较高^[5]。刘芳等已发现乙酰胆碱酯酶不敏感的果蝇、家蝇、埃及伊蚊等抗性昆虫^[6]。目前关于蓖麻蚕在靶标抗性解毒酶分子水平的研究报道很少。本研究根据《化学农药环境安全评价试验准

则》^[7-8]推荐的浸叶法测定辛硫磷对蓖麻蚕 5 龄第 3 天 24 h 的半致死浓度 (LC₅₀), 并采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测添食辛硫磷后乙酰胆碱酯酶基因在不同组织 (血液、脂肪体、中肠、丝腺、头) 中的表达变化, 以期对蓖麻蚕抗药性研究提供基础, 也为害虫的防治提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料与药剂

供试农药: 40% 辛硫磷乳油, 连云港立本农药化工有限公司生产。供试蓖麻蚕品种: 海蓝 (B7) 品种, 由中国农业科学院蚕业研究所提供, 用常规方法催青, 饲养至 5 龄第 3 天, 选取发育一致的正常蓖麻蚕幼虫个体。供试蓖麻叶: 由中国农业科学院蚕业研究所试验场提供, 采摘未施用农药的新鲜 5 龄蓖麻叶。

1.2 菌种与试剂

大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 由笔者所在课题组制备。PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH plus)、pMD[®] 19-T Simple Vector 等, 购自大连宝生物工程公司。TRIzol 试剂, 购自 Promega 公司。

1.3 辛硫磷对蓖麻蚕 LC₅₀ 的测定

采用浸叶法测定辛硫磷对蓖麻蚕 5 龄第 3 天 24 h 的 LC₅₀。参照农药公司推荐的使用浓度和预试验测定的 24 h 蓖麻蚕全部死亡和全部存活的浓度, 正式试验在此浓度范围内重新设定浓度, 以蒸馏水浸泡蓖麻叶为对照。将 40% 辛硫磷原液分别稀释成 35、40、45、50、55、60、65、70 mg/L, 共 8 个浓度梯度。将蓖麻叶切成 1 cm² 左右的方片, 在辛硫磷配制液中浸泡 10 s, 自然晾干后供蓖麻蚕食用。采用添食毒蓖麻叶 1 g/头的标准, 取饲养 20 头 5 龄第 3 天蓖麻蚕为 1 个试验组, 每个浓度 3 次重复, 共计 60 头。将喂食添加辛硫磷农药

收稿日期: 2015-01-07

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (编号: CARS-22)。

作者简介: 陈立华 (1986—), 女, 山东临沂人, 硕士, 主要从事基因克隆与昆虫抗药性研究。E-mail: clhwinner@163.com。

通信作者: 徐安英, 研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为家蚕种质资源与遗传育种。E-mail: srixay@126.com。

后的蓖麻蚕置于温度为 25 ℃、相对湿度 80% 的环境中饲养，24 h 后观察并记录中毒情况及死亡数。

采用 Abbott 公式计算添食辛硫磷后蓖麻蚕的死亡率，当对照组死亡率为 0 时，试验组死亡率 = [(试验蚕数 - 药后活蚕数)/试验蚕数] × 100%；当对照组死亡数 < 10% 时，试验组死亡率 = [(试验组死亡率 - 对照组死亡率)/(1 - 对照组死亡率)] × 100%。在 Excel 中计算出辛硫磷对蓖麻蚕的毒力回归方程和半致死浓度^[9]。

1.4 蓖麻蚕乙酰胆碱酯酶基因的克隆

根据昆虫中已经克隆出来的乙酰胆碱酯酶基因的氨基酸保守序列，用 Primer 5.0 软件设计 2 对简并引物：1F：5′ - GATTGCGATGAGGACACT - 3′，1R：5′ - TGGCTCGAATA-CAGAAGA - 3′；2F：5′ - TCCTTCTTCTGTATTCGAGCCA - 3′，2R：5′ - TGTGATGCTATGGGTTTT - 3′。用 TRIzol 试剂提取蓖麻蚕幼虫的总 RNA，反转录形成 cDNA 作为 PCR 模板。PCR (50 μL) 反应体系：5 μL 10 × LA Taq Buffer II (Mg²⁺ Plus)，8 μL dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L)，上、下游引物各 1 μL，2 μL 模板，0.5 μL Taq 多聚酶，用蒸馏水调节总体积至 50 μL。反应程序为：95 ℃ 预变性 3 min；95 ℃ 30 s，55 ℃ 1 min，72 ℃ 40 s，30 次循环；72 ℃ 10 min。将 PCR 获得的产物经电泳、胶回收后与预期 DNA 片段长度一致的区域连接到载体上并转化到感受态细胞中，经过扩大培养获得菌液，对菌液进行基因测序。对基因序列进行 BLAST 比对和分析。

1.5 蓖麻蚕添食辛硫磷后乙酰胆碱酯酶基因的转录水平测定

根据“1.3”节所述试验方法，在添食 50 mg/L 浓度辛硫磷组中，选取在 24 h 出现轻微中毒现象的活蚕，解剖后取血液、脂肪体、中肠、丝腺、头等 5 个组织，在对照组中选取正常蓖麻蚕的相应组织作为对照。提取总 RNA，将总 RNA 反转录获得 cDNA，以蓖麻蚕 *Actin3* 为内参基因进行实时荧光定量 PCR。反应体系为：10 μL SYBR® Premix Ex Taq™ II，6.6 μL ddH₂O，2 μL 模板，上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL，0.4 μL 50 × Rox Reference Dye，总体积 20 μL。反应程序采用 2 步法：首先 95 ℃ 30 s，消除加样品时产生的气泡；第 1 步 PCR 反应：95 ℃ 预变性 15 s，60 ℃ 退火延伸 30 s，循环 45 次；第 2 步生成熔解曲线，95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s。

2 结果与分析

2.1 辛硫磷对蓖麻蚕的毒力

按照“1.3”节中的试验步骤，测定辛硫磷对蓖麻蚕的 LC₅₀。试验前先进行饥饿处理，保证经辛硫磷浸泡过的蓖麻叶全部被吃完。试验结果表明：试验组中添食 65、70 mg/L 辛硫磷浸泡过的蓖麻叶的蓖麻蚕在第 4 小时首先出现吐水、狂躁、身体扭曲等中毒现象，在第 9 小时出现死亡现象；对照组无中毒现象。统计结果见表 1。

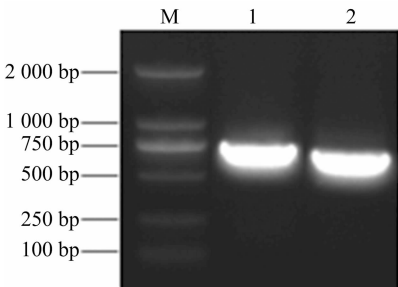
根据表 1 结果，由添食辛硫磷浓度及其对应的死亡率得到辛硫磷对蓖麻蚕的毒力回归方程为 $Y = 2.7114X - 90.475$ ，其中 X 为剂量对数值， Y 为校正死亡率；相关性为 0.9688 ($r^2 > 0.9$)，相关性较好，采用黄剑等推荐的方法^[9]计算出蓖麻蚕对辛硫磷的 LC₅₀ (24 h) 为 51.81 mg/L。

2.2 蓖麻蚕乙酰胆碱酯酶基因的克隆及鉴定

表 1 辛硫磷对蓖麻蚕 24 h 的毒性试验结果

辛硫磷浓度 (mg/L)	供试蚕数 (头)	死亡数 (头)	死亡率 (%)
0	60	0	0
35	60	2	3.3
40	60	11	18.3
45	60	19	31.7
50	60	27	45.0
55	60	31	51.7
60	60	50	83.3
65	60	54	90.0
70	60	55	91.7

用“1.4”节所述的方法进行 PCR 扩增，大约在 710、610 bp 处各出现 1 条单一的条带 (图 1)。将扩增产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序，拼接后获得 1 条 1 339 bp 的序列，经 BLAST 比对，与棉铃虫的 *ace1* 同源性达到 78%；总体分值为 791， E 期望值是 0.0 ($E < 10^{-5}$)；该基因与棉铃虫 *ace1* 覆盖率为 96%，将该基因命名为 *Pcrace1*。

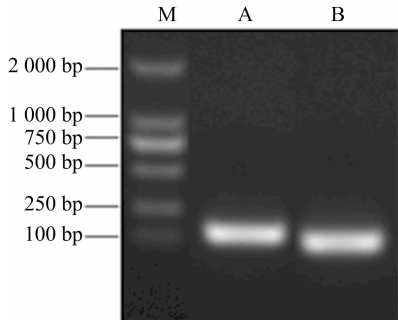


1—710 bp 条带；2—610 bp 条带

图 1 蓖麻蚕的 *ace1* 基因扩增结果

2.3 辛硫磷诱导后 *Pcrace1*、*Pcrace2* 的转录特性

根据上述研究中已经克隆出的蓖麻蚕 *Pcrace1* 的基因序列，利用 Premier 5.0 设计引物得：*Pcrace1* - F：5′ - AGCT-TCAGCCAATCTTAT - 3′；*Pcrace1* - R：5′ - CGGGTGCAGTAT-CAGTTTCA - 3′。*Pcrace2* (基因登录号：KC310801) 的荧光定量的引物为：*Pcrace2* - F：5′ - GGACGGACCGAGTTTCTGC - 3′；*Pcrace2* - R：5′ - TGGCTTCCCTTTTGATTTTGG - 3′^[10]。用荧光定量引物进行 PCR 扩增，电泳后获得单一条带 (图 2)，说明引物具有特异性，可以作为 RT-qPCR 的引物。



A—*Pcrace1*；B—*Pcrace2*

图 2 *Pcrace1*、*Pcrace2* 的扩增结果

按照“1.5”节所述方法进行 RT-qPCR，检测经辛硫磷诱导后 *Pcrace1*、*Pcrace2* 在转录水平上的表达变化，结果如图 3

所示。可见 *Pcrace1* 在脂肪体中的相对表达量比对照组增加 26.50 倍,在头部的转录表达比对照组增加 10.66 倍;*Pcrace2* 在脂肪体中的表达变化量比对照组增加 14.56 倍,在头部的转录表达变化量比对照组增加 24.73 倍,说明乙酰胆碱酯酶主要在头、脂肪体中发挥代谢解毒作用,其中 *Pcrace1* 在脂肪体中发挥解毒作用最大,而 *Pcrace2* 在头部发挥解毒作用最大。*Pcrace1*、*Pcrace2* 在中肠、丝腺中的转录表达变化不大,经辛硫磷诱导后,表达增加倍数分别是 7.65、5.62 和 3.44、2.34 倍,说明中肠、丝腺的代谢解毒作用较小。*Pcrace1*、*Pcrace2* 在血液中表达变化微小,表达增加倍数分别是 2.52、1.11 倍,说明血液几乎不参与代谢解毒作用。

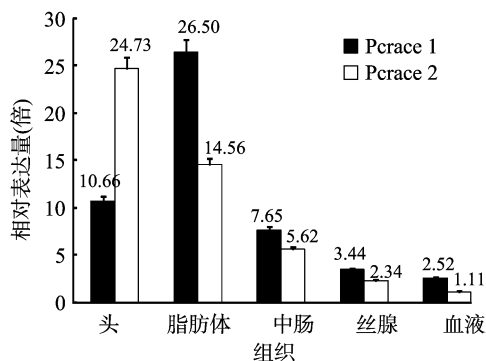


图3 添食辛硫磷后蓖麻蚕各组织中 *Pcrace1*、*Pcrace2* 的相对表达量比较

3 讨论与结论

蓖麻蚕具有广食性、耐粗放饲养、龄期短、蚕丝性能优良等特点,在南方蚕区广为饲养。近几年来,由于农药的频繁使用,蓖麻蚕中毒不结茧等现象时有发生,严重危害养蚕农户经济利益。本研究采用浸叶法测得 40% 辛硫磷乳油对于 5 龄第 3 天蓖麻蚕 24 h 的 LC_{50} 为 51.81 mg/L;而王燕红测定的辛硫磷对 5 龄第 3 天家蚕 24 h 的 LC_{50} 为 7.86 mg/L^[11],辛硫磷对于蓖麻蚕的半致死浓度约为家蚕的 6.6 倍。这可能与两者的体质量差别有关,5 龄第 3 天蓖麻蚕的体质量一般是家蚕的 2~3 倍,使蓖麻蚕解毒能力强于家蚕;另外,蓖麻蚕作为家蚕的近缘物种,其驯化时间远远短于家蚕,长期的野外生存需要更强的环境适应能力,因此具有更强的抗药性。辛硫磷对于蓖麻蚕的半致死浓度远高于家蚕,说明蓖麻蚕的抗药性比家蚕强,这为蓖麻蚕的推广提供了有利条件,也为蓖麻的害虫防治提供理论依据。

鳞翅目昆虫有 2 种乙酰胆碱酯酶(*ace1*、*ace2*),*ace1* 是由 *ace2* 进化得来的,而且都与昆虫的抗药性相关^[12]。本研究使用辛硫磷诱导,经荧光定量 PCR 检测 *Pcrace1*、*Pcrace2* 在蓖麻蚕不同组织(血液、脂肪体、中肠、丝腺、头)中的表达变化。农药诱导后,各组织中的 *Pcrace1*、*Pcrace2* 表达出现变化,在头部、脂肪体中的表达变化最明显,转录水平是正常时的 10 倍以上。*Pcrace1* 在脂肪体中的表达变化最大,辛硫磷诱导前后表达差异达 26.50 倍,这可能与脂肪体是主要的代谢器官有关。刘海涛曾报道,家蚕经辛硫磷诱导后乙酰胆碱酯酶的

活性明显下降,随着辛硫磷在脂肪体中的积累,促进乙酰胆碱酯酶基因的转录表达^[13]。*Pcrace2* 在头部的表达变化最大,推测在头部 *Pcrace2* 比 *Pcrace1* 承担了更重要的解毒作用,这和王燕红的试验结果^[11] 相符合。在中肠中 *Pcrace1*、*Pcrace2* 也发生一定的表达变化,因为中肠是第一道防线,辛硫磷通过中肠进入体内,降低乙酰胆碱酯酶的活性,影响乙酰胆碱酯酶基因的转录表达。*Pcrace1*、*Pcrace2* 在血液、丝腺中的表达变化不大,目前尚未出现关于丝腺、血液对于农药代谢的相关报道。

目前我国对有机磷农药的需求量逐年激增,这虽然可以保证农作物的高产,但是同时也危及食品安全和生态环境,因此低毒安全的有机磷农药研制将是未来农药发展的方向。本研究测定辛硫磷对于 5 龄第 3 天蓖麻蚕 24 h 的 LC_{50} 以及舔食辛硫磷之后乙酰胆碱酯酶基因的表达变化,为有机磷农药的使用及开发提供了理论依据,也为蓖麻蚕的养殖提供了参考。

参考文献:

- [1] 罗恒成. 我国蓖麻蚕在应用研究方面的主要进展[J]. 蚕业科学, 1994, 20(3): 171-179.
- [2] Ji H B, Ju I K, Lee D W, et al. Identification and characterization of *ace1* - type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella* [J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 2005, 81(3): 164-175.
- [3] 贺红武. 有机磷农药产业的现状与发展趋势[J]. 世界农药, 2008, 30(6): 29-33.
- [4] Ishida Y, Leal W S. Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNAs from the wild silkworm, *Antheraea polyphemus* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(12): 1775-1780.
- [5] 王举梅. 家蚕 1 型乙酰胆碱酯酶基因(*ace1*)的结构及其功能研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [6] 刘芳, 孙作洋, 赵士熙, 等. 乙酰胆碱酯酶性质改变与昆虫抗药性的关系[J]. 华东昆虫学报, 2006, 15(3): 187-191.
- [7] 国家环保局. 化学农药环境安全评价试验准则(续)[J]. 农药科学与管理, 1990, 11(4): 4-9.
- [8] 张骞, 崔新倩, 姜辉, 等. 杀虫剂蚊蝇醚对家蚕的毒性评价[J]. 蚕业科学, 2011, 37(4): 760-764.
- [9] 黄剑, 吴文君. 利用 EXCEL 快速进行毒力测定中的致死中量计算和卡方检验[J]. 昆虫知识, 2004, 41(6): 594-598.
- [10] 刘娟, 张月华, 张华光, 等. 蓖麻蚕乙酰胆碱酯酶基因 *Pcrace2* 的克隆及序列与表达分析[J]. 蚕业科学, 2013, 39(3): 460-466.
- [11] 王燕红. 家蚕对有机磷农药的代谢抗性机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [12] 李兵. 家蚕和野桑蚕对有机磷农药抗性的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2009.
- [13] 刘海涛. 家蚕对有机磷农药抗性的性别差异研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.