

# 乙基多杀菌素对棉铃虫解毒酶和乙酰胆碱酯酶活性的影响\*

谢丙堂\*\* 张丽丽 王冰洁 梁革梅\*\*\*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要** 【目的】乙基多杀菌素 (Spinetoram) 是一种新型杀虫剂, 为深入了解其对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 的作用效果和作用机制, 本研究测定了我国不同地区田间棉铃虫种群对乙基多杀菌素的敏感基线, 并比较了不同剂量 (LC<sub>15</sub>、LC<sub>40</sub>、LC<sub>60</sub> 和 LC<sub>80</sub>) 处理后棉铃虫体内解毒酶和乙酰胆碱酯酶活性的变化。【方法】采用药膜法, 对采自不同地区的田间棉铃虫幼虫进行了毒力测定; 采用酶标板动力学方法测定了乙基多杀菌素处理对棉铃虫幼虫 4 种酶活性的影响。【结果】乙基多杀菌素对棉铃虫有很好的胃毒效果, 与阿维菌素相比, 乙基多杀菌素杀虫活性高、见效快、不同地区间差异小; 乙基多杀菌素处理后棉铃虫羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶活性显著降低, 且随着处理剂量的增加活性下降明显, 各剂量处理后棉铃虫两种酶活性抑制率分别为 52.14%~89.46% 和 8.09%~49.81%; 而棉铃虫在取食含乙基多杀菌素的饲料后, 各处理组棉铃虫多功能氧化酶活性表现为先升高、再降低、再升高的趋势, LC<sub>15</sub> 剂量处理时活性最高, 比对照增加 147.75%; 乙酰胆碱酯酶活性随处理剂量增加逐渐升高, 活性最高比对照增加 96.69%。【结论】乙基多杀菌素对棉铃虫的杀虫效果明显优于阿维菌素, 具有广阔的应用前景; 乙基多杀菌素处理棉铃虫引起羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶活性降低、乙酰胆碱酯酶和多功能氧化酶活性升高。**关键词** 乙基多杀菌素, 棉铃虫, 敏感性, 解毒酶, 乙酰胆碱酯酶

## Effects of spinetoram on detoxifying enzyme and acetylcholin esterase activity in *Helicoverpa armigera* (Hübner)

XIE Bing-Tang\*\* ZHANG Li-Li WANG Bing-Jie LIANG Ge-Mei\*\*\*

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract** [Objectives] To investigate the efficacy of the novel pesticide spinetoram as a means of controlling the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) and the mechanism through which this pesticide affects insect pests. [Methods] The baseline susceptibility of *H. armigera* collected from different regions were tested, and changes in their detoxifying enzyme and acetylcholin esterase activity measured, after exposure to different doses of spinetoram (LC<sub>15</sub>, LC<sub>40</sub>, LC<sub>60</sub>, LC<sub>80</sub>). The toxicity of spinetoram to *H. armigera* was tested by spraying the chemical on food, and enzyme activity was measured by measuring enzyme kinetics. [Results] Compared to abamectin, spinetoram had high toxicity to *H. armigera*, achieving higher mortality faster, and differences in susceptibility among populations were small. After treatment with spinetoram, carboxylesterase (CarE) and glutathione-S-transferase (GST) activity significantly reduced in a dose-dependent fashion. The inhibition ratios of these two kinds of enzyme in *H. armigera* after treatment with different doses of spinetoram were 52.14%-89.46% and 8.09%-49.81%, respectively. However, the activity of mixed-functional oxidase (MFO) following treatment with different doses of spinetoram first increased, reduced and increased again; maximum MFO activity was 147.75% higher than that of the control. Acetylcholin esterase (AChE) activity increased with the dosage of spinetoram to

\* 资助项目 Supported projects: 国家科技支撑计划课题(2012BAD19B05)

\*\*第一作者 First author, E-mail: xiebingtang@163.com

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: gmliang@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2015-03-19, 接受日期 Accepted: 2015-03-25

maximum of 96.69% compared to the control. [Conclusion] Spinetoram is highly effective against *H. armigera* compared to abamectin and has good prospects for controlling this pest in the field. The activity of CarE and GST significantly reduced in *H. armigera* larvae after treatment with spinetoram, whereas, the activity of AchE and MFO increased.

**Key words** spinetoram, *Helicoverpa armigera*, susceptibility, detoxifying enzymes, acetylcholin esterase

20 世纪 90 年代初, 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 在我国主要棉区连年暴发成灾, 特别是 1992 年在全国范围内暴发, 造成直接经济损失近百亿元, 暴发的主要原因之一就是棉铃虫对化学农药的高度抗性 (夏敬源和文绍贵, 1993)。自 1997 年转基因抗虫棉推广种植以来, 用于防治棉铃虫的农药用量明显减少 (Lu *et al.*, 2012), 但棉花生长后期 Bt 蛋白表达量下降, 控制 3 代、4 代棉铃虫的效果降低, 有时仍需喷洒化学农药来防治。而且在棉田防治盲蝽、蚜虫等其他害虫也需要使用化学杀虫剂, 因此, 尽管棉铃虫对多种化学农药的抗性水平有所降低, 但还是保留在一定的水平, 如华北棉区与湖北潜江棉铃虫对氰戊菊酯仍具有极高水平抗性 (149~1 219 倍), 江苏盐城种群对氰戊菊酯为高水平抗性 (44 倍) 等 (李亚鹏, 2012)。因此, 开发、利用新型化学农药对有效延缓棉铃虫抗性、保障棉花生产有着重要的作用。

多杀菌素 Spinosad 是由陶氏益农公司 (Dow Agrosciences Company) 开发的一种新型大环内酯类生物源农药产品, 是由土壤放线细菌刺糖多孢菌 *Saccharopolyspora spinosa* 经有氧发酵而成 (Sharma *et al.*, 2007; Vojoudi *et al.*, 2011)。与传统的药剂相比, 多杀菌素对鳞翅目和双翅目幼虫、缨翅目的蓟马有很高的毒杀效果, 对膜翅目、鞘翅目和直翅目中部分害虫有兼治作用; 对鳞翅目幼虫的活性可与拟除虫菊酯类农药媲美, 远远超越有机磷类、氨基甲酸酯类和环戊二烯类杀虫剂 (Saunders, 1996; Gary and Robert, 2000; Thompson *et al.*, 2000)。乙基多杀菌素 (Spenetoram) 是由多杀菌素里的特定成分经化学修饰后改造而成 (Huter, 2011), 与多杀菌素相比, 乙基多杀菌素具有光稳定性好, 杀虫活性高和杀虫范围广, 用量更少等特点; 而且有

研究表明乙基多杀菌素为低抗性风险药剂 (Sial and Brunner, 2010)。乙基多杀菌素 2007 年获得新西兰、美国和加拿大的登记批准正式上市, 2009 年在中国获得登记, 2011 年开始在中国推广使用。

多杀菌素类杀虫剂的作用靶标为昆虫的神经系统, 作用方式主要为触杀和胃毒, 是一种作用机制独特的新生物农药, 经体外试验与几十种药物的靶标位点比较未发现相似的作用机制 (van Steenwyk and Dunley, 2008), 乙基多杀菌素的具体作用位点仍在探索中。目前关于乙基多杀菌素的研究主要是毒力测定 (邱水林和陆致平, 2011; 李伟群等, 2012; 李燕芳等, 2013) 和残留分析 (陈国等, 2014) 等。本文针对乙基多杀菌素对棉铃虫有胃毒效果的作用方式, 测定了乙基多杀菌素对采自我国不同地区棉铃虫种群的敏感基线, 并利用酶动力学方法测定了乙基多杀菌素处理对棉铃虫体内解毒代谢酶系和乙酰胆碱酯酶活性的影响, 结果可以为进一步了解乙基多杀菌素的作用机制、合理应用及延缓抗性产生等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

供试棉铃虫 (96S), 1996 年采自河南省新乡县棉田, 在实验室内用人工饲料饲养至今, 未接触任何杀虫剂。田间棉铃虫种群分别采自安徽 (合肥); 河北 (邯郸、廊坊); 河南 (洛阳); 湖北 (黄冈、潜江); 湖南 (安乡、常德); 江苏 (海门、兴化、徐州); 山东 (长岛、齐河、寿光、泰安、夏津)。采集后在室内饲养 1~2 代, 待达到试验所需虫口数量时进行测试。饲养条件: 温度 (27±2) °C, 相对湿度为 75%±10%, 光周期 14L: 10D (梁革梅等, 1999)。

## 1.2 供试药剂

85.8%乙基多杀菌素、90.4%阿维菌素原药,由中国农业科学院植物保护研究所农药研究室宁君老师提供;对硝基苯甲醚(p-nitroanisole, p-NA)、1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、还原型谷胱甘肽(GSH)、毒扁豆碱、碘化硫代硫酸钠(ATChI)、5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、 $\alpha$ -醋酸萘酯( $\alpha$ -naphthyl acetate,  $\alpha$ -NA)、NADPH、考马斯亮蓝和BSA购自Sigma公司。

## 1.3 毒力生物测定

采用人工饲料药膜法进行室内生物测定(何康等, 1987)。乙基多杀菌素原药溶于二甲基亚砜后,用0.1%的TritonX-100蒸馏水将药剂稀释至不同浓度。将配制好的人工饲料加入24孔养虫板中,待其冷却、获得光滑平整的饲料表面后,在每孔中加入60  $\mu$ L各浓度药剂,缓缓摇动养虫板,使药剂在饲料表面形成药膜,经2 h自然干燥后,每孔接入1头采自不同地区的棉铃虫初孵幼虫。24、48和72 h后检查结果,以毛笔轻触虫体,不能正常反应为死亡。以0.1% TritonX-100水溶液为对照。同时测定阿维菌素对棉铃虫的毒力效果。试验设3次重复。

## 1.4 亚致死浓度处理棉铃虫幼虫及酶液的制备

根据生物测定结果,用LC<sub>15</sub>、LC<sub>40</sub>、LC<sub>60</sub>和LC<sub>80</sub>4个浓度处理4日龄棉铃虫幼虫(96S)。72 h后每个处理挑选存活的幼虫5头置于冰上30 min,各处理设3重复,然后加入匀浆器中,加入预冷的0.15 mol/L氯化钠,冰浴匀浆2~3 min,匀浆液离心15 min(12 000 g, 4 $^{\circ}$ C),取上清液作为酶液, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

## 1.5 解毒酶和乙酰胆碱酯酶活性测定

使用多功能酶标仪测定酶活力(SynergyTMHT, BioTek)。

羧酸酯酶(CarE)活力测定(Han *et al.*, 1998)。依次加入50  $\mu$ L 0.02 mol/L pH 7.6的磷酸缓冲液,200  $\mu$ L 2.1 mmol/L  $\alpha$ -NA(含 $3 \times 10^{-5}$

mol/L 毒扁豆碱),20  $\mu$ L 稀释10倍后的酶液,混匀后于30 $^{\circ}$ C温育15 min。加入200  $\mu$ L 显色液(1%固蓝B盐溶液和5% SDS以体积比2:5临用前混合而成),摇匀后静置5 min,在450 nm波长下每隔1 min记录一次,共记录30次。

谷胱甘肽-S-转移酶活性测定(Oppenoorth *et al.*, 1979)。依次加入100  $\mu$ L 1.2 mmol/L CDNB,90  $\mu$ L 0.1 mol/L pH 7.6的磷酸缓冲液,10  $\mu$ L 稀释10倍的酶液,100  $\mu$ L 6 mmol/L 还原型谷胱甘肽(GSH)。迅速混匀后,在340 nm的波长下每隔1 min记录一次,共记录30次。

多功能氧化酶活性测定(Hansen and Hodgson, 1971)。依次加入100  $\mu$ L pH 7.8磷酸缓冲液,100  $\mu$ L 2 mmol/L 对硝基苯甲醚,10  $\mu$ L 9.6 mmol/L NADPH,90  $\mu$ L 稀释10倍后的酶液,37 $^{\circ}$ C温育10 min。在405 nm波长下,每隔1 min记录一次,共记录30次。

乙酰胆碱酯酶活性测定(Li and Han, 2002)。依次加入50  $\mu$ L 0.1 mol/L pH 7.6的磷酸缓冲液,50  $\mu$ L 的碘化硫代乙酰胆碱(ATChI),50  $\mu$ L 稀释10倍后的酶液。30 $^{\circ}$ C温育15 min,加入50  $\mu$ L 终浓度为0.18 mmol/L DTNB终止反应,在405 nm波长下,每隔1 min记录一次,共记录30次试验。

## 1.6 蛋白质含量测定

考马斯亮蓝(G-250)法进行测定(Bradford, 1976)。

## 1.7 数据分析

利用Polo软件对生测结果进行计算,采用SPSS18.0软件对对各种酶活力测定结果进行单因素方差分析,用Turkey法进行多重比较,显著水平设定为 $P=0.05$ ,用Graphpad Prism 5.02作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙基多杀菌素对各地区田间种群敏感性测定

乙基多杀菌素对各田间种群棉铃虫的毒力

测定结果如表 1。结果显示, 乙基多杀菌素对棉铃虫有很好的胃毒效果, 与阿维菌素相比, 乙基多杀菌素杀虫活性高, 且见效快。阿维菌素对不同地区棉铃虫敏感性有较大差异, 处理 72 h 后不同地区间  $LC_{50}$  最大相差 4.3 倍, 其中山东寿光田间种群对阿维菌素最敏感, 其  $LC_{50}$  为 1.78

mg/L, 而湖北潜江田间种群对阿维菌素最不敏感, 其  $LC_{50}$  为 7.90 mg/L。乙基多杀菌素对采自不同地区的棉铃虫田间种群都有很好的毒杀作用, 地区间差异不大, 处理 72 h 后, 湖南常德田间种群最不敏感, 其  $LC_{50}$  为 0.23 mg/L, 山东夏津田间种群最敏感, 其  $LC_{50}$  为 0.09 mg/L。

表 1 乙基多杀菌素和阿维菌素对棉铃虫的敏感基线

Table 1 The baselines susceptibility of *Helicoverpa armigera* to spinetoram and abamectin

		阿维菌素 Abamectin $LC_{50}$ (mg/L) (95% FL)			乙基多杀菌素 Spinetoram $LC_{50}$ (mg/L) (95% FL)		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
		徐州 Xuzhou	30.17 (3.99-228.17)	13.02 (4.61-36.33)	7.85 (3.34-18.44)	0.51 (0.23-1.13)	0.42 (0.22-0.81)
夏津 Xiajin	15.32 (4.61-50.96)	9.93 (2.11-46.61)	6.47 (4.38-9.56)	0.17 (0.13-0.22)	0.11 (0.048-0.24)	0.091 (0.044-0.19)	
长岛 Changdao	15.77 (3.28-24.37)	7.61 (3.21-18.04)	5.61 (2.12-14.87)	0.92 (0.68-1.23)	0.63 (0.12-3.15)	0.14 (0.082-0.26)	
山东 Shandong	黄冈 Huanggang	126.77 (1.12-1177.60)	8.35 (3.61-19.32)	5.14 (2.33-11.33)	0.43 (0.35-0.52)	0.20 (0.14-0.28)	0.14 (0.091-0.22)
	泰安 Taian	16.71 (1.78-157.06)	7.13 (2.27-22.47)	4.74 (1.97-11.37)	3.74 (1.13-12.36)	0.20 (0.098-0.40)	0.18 (0.099-0.31)
	齐河 Qihe	8.17 (3.33-20.06)	5.24 (2.18-12.60)	3.08 (1.58-6.00)	0.60 (0.32-1.13)	0.36 (0.23-0.58)	0.17 (0.11-0.25)
	寿光 Shouguang	5.78 (1.24-27.01)	4.83 (2.58-9.03)	1.78 (1.17-2.69)	0.59 (0.36-0.98)	0.18 (0.10-0.33)	0.12 (0.075-0.19)
河北 Hebei	邯郸 Handan	20.32 (3.49-117.88)	6.11 (2.58-14.49)	3.75 (2.57-5.45)	0.23 (0.18-0.30)	0.17 (0.11-0.25)	0.11 (0.062-0.21)
	廊坊 Langfang	20.69 (3.67-116.52)	5.31 (2.53-11.18)	3.07 (2.06-4.59)	0.58 (0.31-1.06)	0.36 (0.21-0.61)	0.19 (0.13-0.27)
湖南 Hunan	常德 Changde	15.19 (4.94-46.74)	10.18 (3.69-28.09)	5.56 (2.64-11.69)	0.51 (0.23-1.14)	0.36 (0.19-0.68)	0.23 (0.18-0.31)
	安乡 Anxiang	15.64 (2.06-48.09)	5.40 (3.21-9.08)	1.83 (1.20-2.79)	0.19 (0.15-0.23)	0.13 (0.080-0.21)	0.12 (0.075-0.19)
江苏 Jiangsu	兴化 Xinghua	28.75 (4.31-191.96)	17.74 (3.51-89.67)	6.58 (3.33-13.03)	0.65 (0.33-1.26)	0.44 (0.28-0.69)	0.22 (0.16-0.30)
	海门 Haimen	14.58 (4.67-45.52)	7.23 (3.36-15.53)	4.10 (1.90-8.82)	0.66 (0.32-1.37)	0.26 (0.22-0.32)	0.14 (0.083-0.24)
湖北 Hubei	潜江 Qianjiang	23.44 (3.81-144.34)	18.21 (3.15-105.18)	7.90 (3.19-19.57)	0.24 (0.18-0.31)	0.15 (0.092-0.25)	0.12 (0.064-0.21)
安徽 Anhui	合肥 Hefei	21.95 (3.88-124.16)	9.07 (3.92-21.03)	4.32 (2.61-7.16)	1.13 (0.76-1.70)	0.38 (0.30-0.48)	0.13 (0.073-0.24)
河南 Henan	洛阳 Luoyang	8.68 (3.48-21.62)	6.56 (2.31-17.69)	3.83 (1.73-8.47)	0.64 (0.43-0.95)	0.22 (0.12-0.39)	0.18 (0.12-0.28)

### 2.2 乙基多杀菌素对羧酸酯酶活性的影响

用 4 种剂量 (LC<sub>15</sub>、LC<sub>40</sub>、LC<sub>60</sub> 和 LC<sub>80</sub>) 乙基多杀菌素处理 4 日龄棉铃虫幼虫 72 h 后, 羧酸酯酶 (CarE) 活性显著降低, 且随着处理剂量的升高活性下降明显 (图 1)。处理剂量为 LC<sub>15</sub> 时, CarE 活性比对照组降低 52.14%; 处理剂量为 LC<sub>60</sub> 时, CarE 活性下降最多, 酶活性比对照降低了 89.46%。

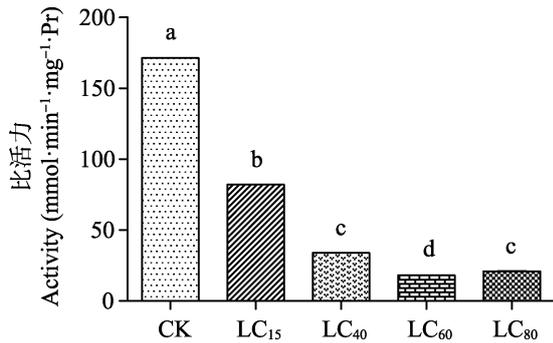


图 1 乙基多杀菌素对棉铃虫羧酸酯酶 (CarE) 比活力的影响

Fig. 1 The effect of spinetoram on CarE activity of *Helicoverpa armigera*

柱上标有不同字母表示 0.05 水平显著差异。下图同。  
Histograms with different letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

### 2.3 乙基多杀菌素对谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响

用 4 种剂量乙基多杀菌素处理棉铃虫幼虫 72 h 后, 处理组棉铃虫体内谷胱甘肽-S-转移酶活性也显著降低, 且变化趋势与羧酸酯酶变化趋势大体一致, 随处理剂量升高谷胱甘肽-S-转移酶活性降低显著 (图 2)。处理剂量为 LC<sub>15</sub> 时, GST 活性与对照相比降低了 8.09%; 处理剂量为 LC<sub>60</sub> 时, 乙基多杀菌素对 GST 活性的抑制程度达到最大, 与对照相比降低了 49.81%。

### 2.4 乙基多杀菌素对多功能氧化酶活性的影响

用 4 种剂量乙基多杀菌素处理棉铃虫 72 h 后, 棉铃虫体内 MFO 活性变化如图 3 所示, 各处理组棉铃虫多功能氧化酶活性表现为先升高、

再降低、再升高的趋势。低剂量 LC<sub>15</sub> 处理后棉铃虫体内 MFO 活性显著升高, 与对照组相比升高了 147.75%; LC<sub>40</sub> 处理后 MFO 活性急剧降低, 显著低于对照水平; 随处理剂量再增加, MFO 活性水平逐渐升高, LC<sub>80</sub> 时与对照组相比升高了 94.47%。

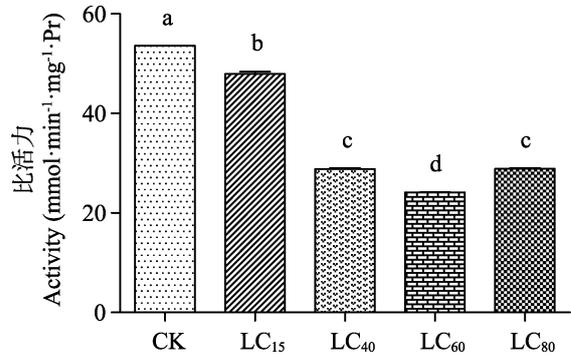


图 2 乙基多杀菌素对棉铃虫谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 比活力的影响

Fig. 2 The effect of spinetoram on GST activity of *Helicoverpa armigera*

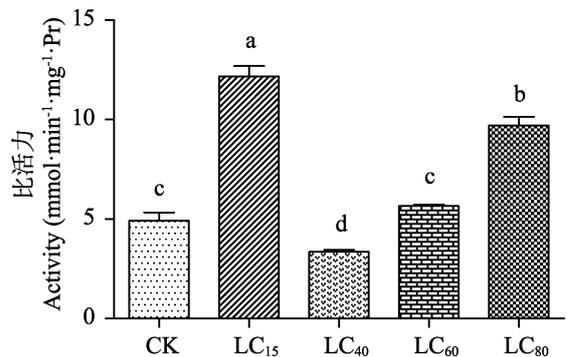


图 3 乙基多杀菌素对棉铃虫多功能氧化酶 (MFO) 酶比活力的影响

Fig. 3 The effect of spinetoram on MFO activity of *Helicoverpa armigera*

### 2.5 乙基多杀菌素对乙酰胆碱酯酶活性的影响

用 4 种剂量乙基多杀菌素处理棉铃虫 72 h 后, 棉铃虫体内 AchE 活性升高, 且随着处理剂量的增加酶活性增长显著 (图 4)。处理剂量为 LC<sub>15</sub> 时, AchE 活性与对照相比差异不显著; 从 LC<sub>40</sub> 开始, 随处理浓度升高, 棉铃虫体内 AchE 活性逐渐升高, 剂量为 LC<sub>80</sub> 时, AchE 活性比对照升高了 96.69%。

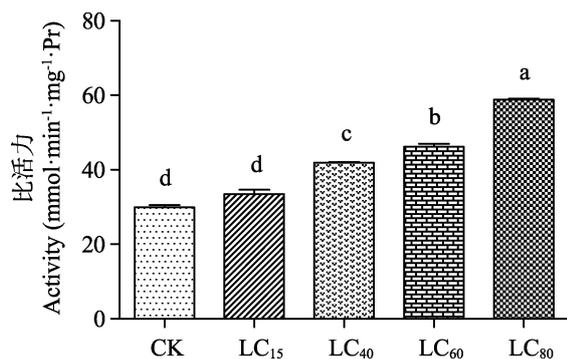


图 4 乙基多杀菌素对棉铃虫乙酰胆碱酯酶 (AChE) 酶比活力的影响

Fig. 4 The effect of spinetoram on AChE activity of *Helicoverpa armigera*

### 3 讨论

多杀菌素类杀虫剂的作用靶标主要是烟碱型乙酰胆碱受体 (Nicotinic acetylcholine receptors, AchRs) (Salgado, 1998), 其次还作用于氨基丁酸 (GABA) 受体 (Watson, 2001)。而阿维菌素类仅作用于氨基丁酸受体, 这种双作用靶标使多杀菌素类杀虫剂杀虫效果优于阿维菌素。乙基多杀菌素作为多杀菌素类杀虫剂的第二代产品, 是经过特定的修饰之后合成的 (Sparks *et al.*, 2008), 具有更优于多杀菌素的杀虫效果 (杜静等, 2010)。本研究结果显示, 乙基多杀菌素对棉铃虫有很好的胃毒效果, 与阿维菌素相比, 乙基多杀菌素杀虫活性高、见效快。阿维菌素在田间已使用多年, 对不同地区棉铃虫敏感性有显著差异, 最大相差 4.3 倍, 表明部分地区棉铃虫已经对阿维菌素有一定的耐受性; 而乙基多杀菌素对不同地区棉铃虫都有很好的毒杀作用, 地区间差异不显著。已有的报道表明, 乙基多杀菌素对稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、斜纹夜蛾 *Prodenia litura* 等都具有很好的防治效果, 速效性和持效性都明显优于对照药剂 (覃振新等, 2011; 邱水林和陆致平, 2011; 付文君等, 2013), 因此, 作为一种高效低毒环境友好型杀虫剂, 乙基多杀菌素具有广阔的应用

前景。

酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶和多功能氧化酶是昆虫体内三大主要解毒代谢酶系, 在昆虫受到来自外界各种有毒物质的伤害时, 会发挥一定的防御作用。在持续的选择压力下, 昆虫体内三大主要解毒代谢酶对某种杀虫剂形成的强解毒能力是昆虫产生抗性的一种重要的生理生化机制。一些研究结果认为具有不同作用靶标的杀虫剂之间存在交互抗性的主要原因就是生物体内存在一套完备的解毒代谢机制 (Rodriguez *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Lumjuan *et al.*, 2005)。酯酶在昆虫体内广泛存在, 参与多种药剂代谢, 酯酶在昆虫体内活性升高 (Argentine *et al.*, 1992) 表达量增加都会影响昆虫对药剂的敏感性变化 (Mouches *et al.*, 1987)。谷胱甘肽-S-转移酶通过共轭作用与昆虫体内杀虫剂结合, 将杀虫剂降解为巯基尿酸类物质排出体外, 主要参与有机磷和拟除虫菊酯类杀虫剂的解毒代谢; 张文吉等 (1996) 认为 GST 是棉铃虫对菊酯类杀虫剂产生抗性的一种重要机制。我们的试验结果显示乙基多杀菌素处理棉铃虫后, 导致棉铃虫羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶活性明显降低, 如果这两种酶的活性升高, 可能会导致棉铃虫的抗性产生。

MFO 主要是由细胞色素 P450 主导, 是最古老、最庞大的超基因家族之一 (Nelson *et al.*, 1993), MFO 主要参与有机氯、有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类等多种杀虫剂的代谢; Scott 等认为昆虫细胞色素 P450 是昆虫产生抗性和交互抗性的重要因素 (Scott and Wen, 2001)。Wang 等 (2009) 的研究结果表明 MFO 可能参与棉铃虫对多杀菌素的代谢; 而且 MFO 也参与了甜菜夜蛾、斑潜蝇对多杀菌素的代谢 (Osorio *et al.*, 2008; Maritza *et al.*, 2012)。Sial 等 (2011) 用乙基多杀菌素对蔷薇斜条卷叶蛾进行 12 代抗性筛选, 产生了低水平抗性, 乙基多杀菌素筛选品系 MFO 活性升高, 因此他们推测 MFO 可能参与乙基多杀菌素的代谢 (Sial and Brunner, 2012)。我们的试验中, 乙基多杀菌素处理使棉

铃虫的多功能氧化酶活性升高,因此,MFO 也可能是棉铃虫对乙基多杀菌素产生抗性的潜在因子。

乙基多杀菌素通过刺激神经系统中的乙酰胆碱受体,导致非正常的乙酰胆碱受体激活,从而不能对正常的抑制和兴奋性信号进行识别,引起靶标害虫在中毒初期表现异常兴奋,非功能性的肌收缩,浑身震颤,后逐渐衰竭、麻痹,最后昆虫中毒死亡(Salgado, 1998)。烟碱型乙酰胆碱受体(Nicotinic acetylcholine receptors, AchRs)是多杀菌素类杀虫剂的作用靶标,在突触间兴奋性神经递质传递过程中起重要作用。脊椎动物中,在中枢神经系统和外周神经系统肌肉中均有分布(Madden, 2002),昆虫中,主要存在于中枢神经系统中(Millar and Denholm, 2007)。乙酰胆碱酯酶(AchE)是突触间神经传导过程中具有重要作用的酶,在昆虫体内正常的生理功能是将与乙酰胆碱受体(AchRs)结合的乙酰胆碱分子分解为胆碱和乙酸,维持正常的突触间神经传导。研究表明(刘丹等, 2012),黄褐天幕毛虫 *Malacosoma neustria testacea* 4龄幼虫经多杀菌素处理 3、6 和 12 h, AchE 活力均显著高于对照,但 24 h 显著低于对照;5 龄幼虫随着处理时间延长, AchE 活力逐渐降低,且均显著低于对照。本研究结果表明,乙基多杀菌素处理的棉铃虫 AchE 活力增加,推测其在乙基多杀菌素毒杀棉铃虫过程中起到了一定的作用,具体机制需进一步开展研究。

## 参考文献 (References)

- Argentine JA, Clark JM, Lin H, 1992. Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 44(3): 191–207.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1): 248–254.
- Chen G, Zhu Y, Zhao J, Yang T, Zhang Y, Wu YL, 2014. Residue and decline dynamics of spinetoram in paddy water, soil and rice straw. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 16(2): 153–158. [陈国, 朱勇, 赵健, 杨挺, 张艳, 吴银良, 2014. 乙基多杀菌素在稻田水、土壤和水稻植株中的残留及消解动态. 农药学报, 16(2): 163–158.]
- Du J, Liu CX, Wang XJ, Xiang WS, 2010. A novel green insecticide: spinetoram. *World Pesticides*, 32(4): 55–58. [杜静, 刘重喜, 王相晶, 向文生, 2010. 新颖绿色杀虫剂-spinetoram. 世界农药, 32(4): 55–58.]
- Fu WJ, He J, Mi H, Tu EX, Guo WC, 2013. Preliminary exploration into the control effects of six new kinds of medicaments to prevent and treat Colorado potato beetles in the fields. *Xinjiang Agricultural Science*, 50(8): 1482–1487. [付文君, 何江, 米慧, 吐尔逊, 郭文超, 2013. 6 种新型药剂防治马铃薯甲虫田间药效初探. 新疆农业科学, 50(8): 1482–1487.]
- Gary D, Robert D, 2000. Spinosad a case study: an example from a nature products discovery programme. *Pest Management Science*, 56(8): 696–702.
- Han ZJ, Moores GD, Denholm I, 1998. Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62(3): 164–171.
- Hansen LG, Hodgson E, 1971. Biochemical characteristics of insect microsomes N-andO-demethylation. *Biochemical Pharmacology*, 20(70): 1569–1578.
- Huter OF, 2011. Use of natural products in the crop protection industry. *Phytochemistry Reviews*, 10(2): 185–194.
- He K, Liu RL, Lu LS, 1987. China's Agricultural Encyclopedia (Pesticides). Beijing: Agricultural Press. 61–84. [何康, 刘瑞龙, 卢良恕, 1987. 中国农业百科全书(农药卷). 北京: 农业出版社. 61–84.]
- Kim YJ, Lee SH, Lee SW, 2004. Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Management Science*, 60(10): 1001–1006.
- Li F, Han ZJ, 2002. Purification and characterization of acetylcholinesterase from cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover). *Arch Insect Biochemi. Physiol.*, 51(1): 37–45.
- Li WQ, Zeng DQ, Xian ZH, 2012. Fields efficacy of spinetoram against Thrips palmi Karny. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 18(5): 92–93. [李伟群, 曾东强, 贤振华, 2012. 6%乙基多杀菌素悬浮剂防治棕榈蓟马药效试验. 安徽农学通报, 18(5):

- 92-93.]
- Li YF, Xiao HX, Zhang Y, Xie ZN, Wang P, Yao ZW, 2013. Indoor toxicity and field efficacy of spinetoram against larvae of rice leaf roller, *Cnaphalocrocis medinalis* Guenee. *Journal of Southern Agriculture*, 44(8): 1282-1285. [李燕芳, 肖汉祥, 张扬, 谢忠能, 黄新培, 王彭, 姚振武, 2013. 乙基多杀菌素对稻纵卷叶螟室内毒力测定及田间药效试验. 南方农业学报, 44(8): 1282-1285.]
- Li YP, 2012. Resistance monitoring to three insecticides and resistance mechanism to fenvalerate in *Helicoverpa armigera*. Master Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [李亚鹏, 2012. 棉铃虫田间种群对三种杀虫剂的抗性检测及对氟戊菊酯抗性机理的研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 1999. An improvement in the technique of artificial rearing cotton bollworm. *Plant Protection*, 25(2): 15-17. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 1999. 棉铃虫人工饲料技术的改进. 植物保护, 25(2): 15-17.]
- Liu D, Yan SC, Cao CW, Liao YZ, 2012. Effect of spinosad on the detoxifying and protective enzymes of *Malacosoma neustria* Testacea. *Scientia Silvae Sinicae*, 48(4): 67-74. [刘丹, 严善春, 曹传旺, 廖月枝, 2012. 多杀菌素对黄褐天幕毛虫解毒酶及保护酶的影响. 林业科学, 48(4): 67-74.]
- Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Guo YY, Desneux N, 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487(7407): 362-365.
- Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara LA, 2005. Elevated activity of an epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 35(8): 861-871.
- Madden DR, 2002. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3(2): 91-101.
- Maritza R, Karen R, Lucia A, Myriam S, Beno S, 2012. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(1): 45-50.
- Millar NS, Denholm I, 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert. Neurosci.*, 7(1): 53-66.
- Mouches C, Magnin M, Berge JB, Silvestri MD, Beyssat V, Pasteur N, Georghiou GP, 1987. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(8): 2113-2116.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW, 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 12(1): 1-51.
- Oppenoorth FJ, Van der Pas LJT, Houx NWH, 1979. Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 11(1): 176-188.
- Osorio A, Martinez AM, Schneider MI, Diaz O, Corrales JL, Aviles MC, Smagghe G, Pineda S, 2008. Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico. *Pest Management Science*, 64(10): 1001-1007.
- Ou SS, Liang P, Song DL, Shi XY, Gao XW, 2012. Effects of sublethal dosage of chlorantraniliprole on development and detoxifying enzymes activity of *Helicoverpa armigera*. *Plant Protection*, 38(3): 1-8. [欧善生, 梁沛, 宋敦伦, 史雪岩, 高希武, 2012. 氯虫苯甲酰胺亚致死剂量对棉铃虫生长发育和解毒酶活性的影响. 植物保护, 38(4): 1-8.]
- Qiu SL, Lu ZP, 2011. Field efficacy of spinetoram against Noctuidae pests of cabbage. *Shanghai Vegetables*, (3): 52-53. [邱水林, 陆致平, 2011. 6%乙基多杀菌素悬浮剂防治甘蓝夜蛾类害虫田间药效试验. 上海蔬菜, (3): 52-53.]
- Rodriguez MM, Bisset J, Ruiz M, 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol.*, 39(6): 882-888.
- Salgado VL, 1998. Studies on the Mode of action of Spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 60(2): 91-102.
- Saunders DG, 1996. Fate of spinosad in the environment. *Down to Earth*, 52(1): 21-28.
- Scott JG, Wen Z, 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science*, 57(10): 958-967.
- Sharma A, Srivastava A, Ram B, Srivastava PC, 2007. Dissipation behaviour of spinosad insecticide in soil, cabbage and cauliflower under subtropical conditions. *Pest Management Science*, 63(11): 1141-1145.

- Sial AA, Brunner JF, 2010. Assessment of resistance risk in oblique banded leaf roller (Lepidoptera: Tortricidae) to the reduced-risk insecticides Chlorantraniliprole and Spinetoram. *J. Econ. Entomol.*, 103(4): 1378–1385.
- Sial AA, Brunner JF, Garczynski SF, 2011. Biochemical characterization of chlorantraniliprole and spinetoram resistance in laboratory-selected obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(3): 274–279.
- Sial AA, Brunner JF, 2012. Selection for resistance, reversion towards susceptibility and synergism of chlorantraniliprole and spinetoram in obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Management Science*, 68(3): 462–468.
- Sparks TC, Crouse GD, Dripps JE, Anzeveno P, Martynow J, DeAmicis CV, Gifford J, 2008. Neural network-based QSAR and insecticide discovery: spinetoram. *Comput. Aided Mol. Des.*, 22(6): 393–401.
- Tan ZX, Lin WJ, Li CY, Huang JY, 2011. Preliminary study of field efficacy of spinetoram against larvae of rice leaf roller, *Cnaphalocrocis medinalis* Guenee. *Guangxi Plant Protection*, 24(4): 12–13. [覃振新, 林韦加, 李春元, 黄俭勇, 2011. 6%乙基多杀菌素悬浮剂防治稻纵卷叶螟田间药效试验结果初报. 广西植保, 24(4): 12–13.]
- Thompson GD, Dutton R, Sparks TC, 2000. Spinosad—a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science*, 56(8): 696–702.
- van Steenwyk RA, Dunley JE, 2008. Spinetoram—a Second Generation Spinosyn Insecticide for Pear Pest Management. Proceedings of the Xth International Pear Symposium. Peniche, Portugal. 867–873
- Vojoudi S, Saber M, Hejazi MJ, Talaei-Hassanloui R, 2011. Toxicity of chlorpyrifos, spinosad and abamectin on cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and their sublethal effects on fecundity and longevity. *Bulletin of Insectology*, 64(2): 189–193.
- Wang D, Qiu XH, Ren XX, Zhang WC, Wang KY, 2009. Effects of spinosad on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China: tolerance status, synergism and enzymatic responses. *Pest Management Science*, 65(9): 1040–1046.
- Watson GB, 2001. Action of insecticidal spinosyns on gaminbutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 71(1): 20–28.
- Xia JY, 1993. Causes and management strategies of north China *Helicoverpa armigera* outbreaks into plague. *China Cotton*, (2): 9–12. [夏敬源, 文绍贵, 1993. 北方棉铃虫暴发成灾原因与治理对策. 中国棉花, (2): 9–12.]
- Zhang WJ, Zhang YJ, Han XL, 1996. Studies on the carboxylesterase, glutathione-S-transferase and acetylcholinesterase in different ages of *Helicoverpa armigera* larva. *Acta Phytophylacica Sinica*, 23(2): 157–162. [张文吉, 张友军, 韩熹莱, 1996. 棉铃虫不同龄期幼虫羧酸酯酶、谷胱甘肽转移酶、乙酰胆碱酯酶研究. 植物保护学报, 23(2): 157–162.]