

辛硫磷对枸杞木虱的毒力及其羧酸酯酶的抑制作用

王立宇^{1,2}, 段立清¹, 李海平^{*1}, 王莹³, 许胜利²

(1. 内蒙古农业大学 农学院, 呼和浩特 010019; 2. 鄂尔多斯林业局 森林保护站, 鄂尔多斯 017000;
3. 鄂尔多斯园林局, 鄂尔多斯 017000)

摘要: 分别采用浸渍法和药膜法测定了辛硫磷对枸杞木虱不同发育期若虫和成虫的毒力, 同时测定了辛硫磷对不同龄期枸杞木虱羧酸酯酶 (CarE) 活性的抑制作用及酶的动力学常数。结果表明: 辛硫磷对枸杞木虱的 LC_{50} 值随若虫龄期的增大而升高, 至成虫期再相对降低, 其对 5 龄若虫的 LC_{50} 值为 0.995 mg/L, 是对 1 龄若虫 LC_{50} 值 (0.047 mg/L) 的 21.2 倍。辛硫磷对不同龄期枸杞木虱羧酸酯酶活性的抑制作用 I_{50} 值及酶的 K_m 和 V_{max} 值也均随着试虫龄期的增大而升高, 至成虫期则 I_{50} 值稍有降低。研究表明, 辛硫磷对枸杞木虱的毒力与对其羧酸酯酶活性的抑制作用间存在密切关系, 利用辛硫磷防治枸杞木虱时, 以选择龄期较低时用药为宜。

关键词: 枸杞木虱; 辛硫磷; 致死中浓度; 羧酸酯酶; 抑制中浓度

中图分类号: S482.3; S481.1 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2016)05-0656-03

Toxicity of phoxim to *Paratrioza sinica* and inhibition to carboxylesterase of it in different instars

WANG Liyu^{1,2}, DUAN Liqing¹, LI Haiping^{*1}, WANG Ying³, XU Shengli²

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China;
2. Forestry Protection Station of Erdusi Forestry Bureau, Erdusi 017000, China;
3. Bureau of Parks and Garden of Erdousi, Erdousi 017000, China)

Abstract: The toxicities of phoxim to *Paratrioza sinica* in different stages were tested, and the kinetic constants of carboxylesterase (CarE) and the inhibition of phoxim on CarE were also studied. The results indicated that the median lethal concentration (LC_{50}) of phoxim to *P. sinica* increased with the increase of the nymph stage, but it marginally decreased during the adult stage. The LC_{50} of phoxim to the first instar nymph was 0.047 mg/L. The LC_{50} to the fifth instar nymph (0.995 mg/L) was 21.2 times higher than that of the first instar nymph. The K_m and V_{max} values of CarE in *P. sinica* increased as the nymph grew older. The median inhibitory concentrations (I_{50}) of phoxim to CarE was also increased with the growth of nymph. The results showed that the toxicities of phoxim to *P. sinica* were closely related to the activities of CarE in different stages. To achieve good control effect of *P. sinica*, phoxim should be applied to the small nymph.

Keywords: *Paratrioza sinica*; phoxime; median lethal concentration (LC_{50}); carboxylesterase (CarE); median inhibitory concentration (I_{50})

收稿日期: 2016-03-08; 录用日期: 2016-07-18.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260440).

作者简介: 王立宇, 男, 硕士研究生, E-mail: wangly_316@163.com; *李海平, 通信作者 (Author for correspondence), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫毒理学, E-mail: lihaiping5820@hotmail.com

枸杞木虱 *Paratrioza sinica* Yang & Li 是枸杞栽培区的“三大害虫”之一^[1], 其成虫和若虫可刺吸危害枸杞叶片、嫩梢、幼果及花蕾, 造成枯叶及果实早落, 严重影响枸杞品质和产量。目前主要采用化学药剂防治, 用药品种多, 防效差异较大。辛硫磷属低毒有机磷类杀虫剂, 触杀性好, 残留期短, 是防治枸杞防木虱的常用药剂之一^[2-3]。但现有研究主要集中在其防效上, 尚未见关于其防治时期及机理等的深入研究。

羧酸酯酶 (CarE) 是昆虫体内重要的解毒酶, 也是包括辛硫磷在内的多种有机磷类杀虫剂的作用靶标^[4]。因此, 笔者研究了辛硫磷对不同龄期枸杞木虱的毒力及对其羧酸酯酶的抑制作用, 探讨了各龄期枸杞木虱对辛硫磷的敏感性差异与羧酸酯酶活性之间的关系, 以期在选择枸杞木虱防治的适宜施药时期及其作用机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试虫 枸杞木虱 *Paratrioza sinica* Yang & Li, 取自内蒙古农业大学科技园区未使用过任何农药的枸杞林。

1.1.2 供试药剂 80.5% 辛硫磷 (phoxim) 原药由中国农业大学高希武教授提供; α -乙酸萘酯 (α -NA) 及固蓝 B 盐为 Sigma 公司产品。

1.2 毒力测定方法

对若虫的毒力测定采用联合国粮食及农业组织 (FAO) 推荐的浸渍法^[5]。辛硫磷原药用丙酮稀释为 1 000 mg/L 的母液, 根据预试验结果, 再用水稀释至 5~6 个浓度, 以含试验中最高浓度丙酮的清水为对照。选择枸杞木虱若虫数不少于 25 头的枸杞叶片, 在各浓度药液中浸渍 5 s 后取出, 阴干后放入底部垫有湿滤纸的培养皿中, 用蘸水的脱脂棉缠绕叶柄保湿。每浓度设 3 次重复, 24 h 后检查、记录死亡虫数。以解剖针轻触虫体, 无任何反应者即为死亡。

对成虫的毒力采用药膜法^[6-7]测定。药液配制方法同上, 以丙酮作对照。将 1 mL 药液倒入指形管, 转动指形管使形成均匀的药膜。每浓度设 3 次重复, 每重复为 1 管, 至少接入 20 头成虫, 用脱脂棉封住管口。24 h 后检查、记录死亡虫数。成虫不爬行或足收缩不动即为死亡。

1.3 羧酸酯酶活性测定

1.3.1 酶液制备 取 200 头枸杞木虱, 加入 2 mL

预冷的 0.04 mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液 (含体积分数 0.1% 的 triton X-100), 于玻璃匀浆器中冰浴匀浆。匀浆液于 12 000 r/min、4 ℃ 离心 20 min, 取上清液作为酶液, 4 ℃ 冷藏。

1.3.2 酶活性测定 参照 Van Asperen^[8]的方法测定羧酸酯酶的比活力。

1.3.3 枸杞木虱羧酸酯酶特性测定 将底物 α -NA 用缓冲液稀释为系列梯度浓度, 再分别与枸杞木虱羧酸酯酶酶液反应, 参照 Van Asperen^[8]的方法测定酶活性, 每浓度重复 3 次。通过 Enzyfit 软件, 分别求出米氏常数 K_m 及最大反应速率 V_{max} 。

1.3.4 蛋白质含量测定 参照考马斯亮蓝 G-250 染色法^[9]测定。

1.4 辛硫磷对羧酸酯酶的抑制作用测定

参照高希武等^[10]的方法进行。在反应管中分别加入 0.1 mL 辛硫磷和 0.1 mL 酶液, 30 ℃ 水浴保温 10 min 后, 加入 1.8 mL 1.2×10^{-3} mol/L 的 α -NA, 继续在 30 ℃ 下振荡反应 10 min, 加入 0.9 mL 显色剂, 室温放置 10 min, 在 600 nm 波长下测 OD 值。对照管和调零管用磷酸缓冲液代替辛硫磷。

1.5 数据统计分析

采用 POLO-PC 软件求出辛硫磷对枸杞木虱若虫和成虫的致死中浓度 (LC_{50}) 值; 通过 SAS 数据处理系统得到辛硫磷对枸杞木虱羧酸酯酶的抑制中浓度 (I_{50}) 值; 采用 One-way ANOVA with Dunnet's 新复极差法进行差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 辛硫磷对各龄期枸杞木虱的毒力

毒力测定结果见表 1。辛硫磷对枸杞木虱若虫的 LC_{50} 值随着试虫龄期的增大而升高, 表明随若虫龄期增大, 枸杞木虱对辛硫磷的敏感性降低; 但其对成虫的毒力介于 2~3 龄若虫之间, 即枸杞木虱成虫对辛硫磷反而又比较敏感。

表 1 辛硫磷对各龄期枸杞木虱的毒力			
Table 1 Toxicities of phoxim to <i>P. sinica</i> in different instars			
试虫龄期 Instars	$LC_{50}/(mg/L)$	95% 置信限 95% Fiducial limit	斜率 Slope $\pm$ SE
1	0.047	0.018~0.108	0.458 $\pm$ 0.053
2	0.051	0.014~0.127	0.494 $\pm$ 0.066
3	0.261	0.105~0.472	1.052 $\pm$ 0.165
4	0.861	0.477~1.410	1.495 $\pm$ 0.208
5	0.995	0.432~2.200	0.639 $\pm$ 0.086
成虫 Adult	0.082	0.006~0.353	0.484 $\pm$ 0.109

2.2 枸杞木虱羧酸酯酶的特性

表 2 表明：1~3 龄枸杞木虱若虫羧酸酯酶的 K_m 值显著小于 4 龄、5 龄及成虫，说明 1~3 龄枸杞木虱羧酸酯酶对 α -NA 的亲性和性较强。 V_{max} 表征酶的催化活性，该值越大表明酶的催化活性越高。由表 2 可见， V_{max} 值总体上也随着试虫龄期的增大而显著升高。

表 2 各龄期枸杞木虱羧酸酯酶的 V_{max} 及 K_m 值
Table 2 The V_{max} and K_m values of CarE in *P. sinica* in different instars

试虫龄期 Instars	最大反应速率 $V_{max}/(\mu\text{mol}/(\text{mg pro.}\cdot\text{min}))$	米氏常数 $K_m/(\mu\text{mol}/\text{L})$
1	0.078 ± 0.012 ab	0.377 ± 0.144 ab
2	0.065 ± 0.011 a	0.315 ± 0.138 a
3	0.148 ± 0.030 b	0.431 ± 0.203 b
4	0.447 ± 0.121 c	0.610 ± 0.345 c
5	0.507 ± 0.037 cd	0.684 ± 0.100 cd
成虫 Adult	0.526 ± 0.100 d	0.719 ± 0.270 d

注：同列数据后不同小写字母表示差异显著。
Note: Data within a column followed by different letters are significantly different ($P\leq0.05$).

2.3 辛硫磷对枸杞木虱羧酸酯酶的抑制作用

表 3 中结果表明，辛硫磷对枸杞木虱羧酸酯酶的 I_{50} 值随若虫龄期的增大而显著增加，说明枸杞木虱若虫对辛硫磷的敏感性随龄期的增大而降低，但至成虫期， I_{50} 值反而又稍有下降，这与毒力测定结果规律一致。

表 3 辛硫磷对枸杞木虱羧酸酯酶的抑制中浓度
Table 3 The I_{50} values of phoxim to the CarE of *P. sinica* in different instars

试虫龄期 Instars	$I_{50}/(\text{mmol}/\text{L})$	95% 置信限 95% Fiducial limit	I_{50} 比值 Ratio of I_{50}
1	5.27	2.05~7.59	1.0
2	8.12	5.90~10.34	1.5
3	17.91	5.90~29.91	3.4
4	24.29	11.67~36.90	4.6
5	37.77	29.20~46.33	7.2
成虫 Adult	35.62	25.03~46.21	6.8

注： I_{50} 比值以辛硫磷抑制 1 龄若虫羧酸酯酶的 I_{50} 值为标准计算得到。
Note: The ratio of I_{50} is calculated based on the I_{50} of phoxim to CarE of the first instar nymph.

3 小结

枸杞是中国西北地区重要的经济作物，也是重要的出口创汇品种，因此其防治药剂的选择及科学合理用药尤为重要。研究表明，枸杞木虱龄期越小，对药剂越敏感，此时辛硫磷对其的 LC_{50} 值和对 CarE 的 I_{50} 值均较低，而随着龄期增大， LC_{50} 值和 I_{50} 值均升高，敏感性降低；至成虫期，

LC_{50} 值和 I_{50} 值则有所降低。因此低龄若虫期，特别是 3 龄以前是辛硫磷防治枸杞木虱的最佳施药时期，建议可在生产实践中加以利用。

参考文献(Reference):

[1] 李锋. 枸杞病虫害可持续调控技术[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 2012: 16-20.
LI F. The sustainable technology of controlling the diseases and insects in Chinese wolfberry[M]. Yinchuan: Ningxia People Press, 2012: 16-20.

[2] 任月萍, 胡忠庆. 宁夏枸杞主要病虫害化学防治研究进展[J]. 宁夏农学院学报, 2004, 25(3): 88-91.
REN Y P, HU Z Q. The progress of research on chemical control for main diseases and insect pests of Chinese wolfberry in Ningxia[J]. J Ningxia Agric Coll, 2004, 25(3): 88-91.

[3] 徐常青, 刘赛, 徐荣, 等. 我国枸杞主产区生产现状调研及建议[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 1979-1984.
XU C Q, LIU S, XU R, et al. Investigation of production status in major wolfberry producing areas of China and some suggestions[J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(11): 1979-1984.

[4] 王旭, 高希武, 郑炳宗, 等. 有机磷药剂对棉铃虫羧酸酯酶的抑制作用[J]. 昆虫学报, 1998, 41(增刊1): 12-18.
WANG X, GAO X W, ZHENG B Z, et al. Inhibition of organophosphate insecticides to carboxylesterase in *Helicoverpa armigera*[J]. Acta Entomology Sinica, 1998, 41(Suppl. 1): 12-18.

[5] 王树礼, 刘德明. 介绍世界粮农组织(FAO)推荐的检测害虫抗药性的浸渍法[J]. 昆虫知识, 1990, 27(3): 172-173.
WANG S L, LIU D M. Introduce the dipping method for detecting insect resistance recommended by the FAO[J]. Chin Bull Entomol, 1990, 27(3): 172-173.

[6] SHOTKOSKI F A, MAYO Z B, PETERS L L. Induced disulfoton resistance in green bugs (Homoptera: Aphididea)[J]. J Econ Entomol, 1990, 83(6): 2147-2152.

[7] 鲁艳辉, 杨婷, 高希武. 禾谷缢管蚜和麦长管蚜玻璃管药膜法敏感毒力基线的建立[J]. 昆虫学报, 2009, 52(1): 52-58.
LU Y H, YANG T, GAO X W. Establishment of baseline susceptibility data to various insecticides for aphids *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) and *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae) by the method of residual film in glass tube[J]. Acta Entomological Sinica, 2009, 52(1): 52-58.

[8] VAN ASPEREN K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method[J]. J Insect Physiol, 1962, 8(4): 401-416.

[9] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1-2): 248-254.

[10] 高希武, 郑炳宗. 几种农药对蚜虫羧酸酯酶的抑制和拟除虫菊酯的增效[J]. 北京农业大学学报, 1991, 17(4): 89-94.
GAO X W, ZHENG B Z. Synergism of inhibitors of carboxylesterase to pyrethroid insecticides in aphids[J]. Acta Agriculture Universitatis Pekingensis, 1991, 17(4): 89-94.

(责任编辑: 唐 静)