

多杀菌素对甜菜夜蛾多酚氧化酶和羧酸酯酶的影响

王光峰¹, 张友军^{1*}, 柏连阳², 吴青君¹, 徐宝云¹, 朱国仁¹

(1 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081;

2 湖南农业大学 植物保护学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 报道了多杀菌素对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 多酚氧化酶 (PPO) 和羧酸酯酶 (CarE) 的影响, 多杀菌素对甜菜夜蛾表现了很高的毒力, 对三龄幼虫的 LC_{50} 值为 0.80 mg/L 。离体条件下, $1.0 \times 10^{-3} \sim 0.5 \text{ mg/L}$ 多杀菌素对甜菜夜蛾多酚氧化酶的抑制率超过 50%, 且表现为随药剂浓度的增加抑制能力增强的趋势。活体条件下, $0.1 \sim 0.8 \text{ mg/L}$ 多杀菌素在处理的早期诱导虫体内多酚氧化酶的活性增加, 但 12 h 后却显著抑制多酚氧化酶的活性。 $1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \text{ mg/L}$ 多杀菌素在离体条件下对羧酸酯酶不表现任何抑制作用, 但活体条件下同样能诱导虫体内羧酸酯酶活性增强。

关 键 词: 多杀菌素; 甜菜夜蛾; 多酚氧化酶; 羧酸酯酶

中图分类号: S482.3; Q965.9

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2003)02-0040-07

多杀菌素 (spinosad) 是放线菌刺糖菌素多孢菌的代谢分泌物, 主要由多杀菌素 A (spinosyn A) 和多杀菌素 D (spinosyn D) 组成, 是美国 Dow AgroSciences 公司于 90 年代末期开发的一种新型抗生素农药, 其第一个商品制剂“Tracer”于 1997 年在美国获准在棉花上登记使用。该杀虫剂集化学农药的高效、速效、广谱和生物农药的低毒、环境友好、对天敌安全等优良特性于一身, 其开发与应用被誉为在抗生素杀虫剂领域具有里程碑的意义, 并于 1999 年获得美国“总统绿色化学挑战奖”^[1,2]。

目前, 新农药的创制正由大量合成、随机筛选向依据药剂作用靶标、空间立体结构及其生理生化特性进行特异性分子设计的生物合理设计方向发展, 药剂作用靶标的研究将在未来新药的创制中起着越来越重要的作用。多杀菌素作为新一代的抗生素农药正广泛应用于多种重要农业害虫的防治, 但目前对该药剂的作用靶标及其毒理学机制认识仍非常有限, 仅有的少数电生理研究结果表明, 多杀菌素对 γ -氨基丁酸 A 型受体^[3]和乙酰胆碱受体^[4]均有一定的作用, 但其主要作用靶标及其可能的其他毒理学机制目前仍不清楚。本研究以农业重要害虫甜菜夜蛾为供试昆虫, 研究了多杀菌素对昆虫体内重要的防御酶系多酚氧化酶和代谢酶系羧酸酯酶的影响, 以期有助于阐明该药剂的毒理机制和主要靶标。

1 材料与方法

1.1 试虫

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 采自北京郊区田间, 已在养虫室 ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, $L/D = 16/8$) 内连续人工饲养约 40 代。

作者简介: 张友军 (1968-), 男, 博士, 副研究员, 从事害虫抗药性、昆虫分子生态学与蔬菜害虫防治等研究
基金项目: “十五”国家科技攻关资助项目 (2002BA516A08、2001BA509B06)。

1.2 供试药剂

2% 多杀菌素 (spinosad) 悬浮剂 (美国陶氏益农公司); 48% 毒死蜱 (chlorpyrifos) 乳油 (通州正大农药厂); 2.5% 高效氯氟氰菊酯 (lambdacyhalothrin) 乳油 (捷利康南通农用化学品有限公司); 90% 灭多威 (methomyl) 可溶性粉剂 (美国杜邦公司); 5% 氟虫腈 (fipronil) 悬浮剂 (安万特杭州作物科学有限公司); 5% 氟啶脲 (chlorfluazuron) 乳油 (日本石原株式会社); 20% 虫酰肼 (tebufenozide) 悬浮剂 (美国罗门·哈斯公司); 高效 Bt 可湿性粉剂 (湖北省农业科学院 Bt 研究开发中心研制)。

α -乙酸萘酯 (α -NA)、 β -乙酸萘酯 (β -NA)、 α -萘酚 (北京益利精细化学公司); 固蓝 B 盐、RR 盐 (Fluka 公司产品)、毒扁豆碱 (Aldrich 公司产品) 等生化试剂均为分析纯。

1.3 生物测定

参照 Moulton 等报道的浸叶法^[5]。配制浓度梯度药剂, 将新鲜甘蓝叶片擦拭干净后浸于各系列浓度药液中 10 s, 以蒸馏水作对照。处理后叶片于室温晾干约 1 h 后转移至培养皿中, 每皿接大小一致的 3 龄幼虫 10 头, 每处理重复 3 次共 30 头幼虫。处理后试虫放于 26 ± 1 的观测室中, 48 h 或 96 h (Bt、氟啶脲、虫酰肼) 后检查死亡虫数。用 Probit 软件处理试验结果, 计算各药剂 LC_{50} 及其回归方程。

1.4 多酚氧化酶 (PPO) 活性测定

1.4.1 活体测定 参照 Ishaay 等方法^[6]并略作修改。取发育一致的 4 龄幼虫, 先饥饿 4~6 h 后待用。配制 0.1 mg/L (死亡率小于 20%, 即亚致死剂量)、0.25 mg/L、0.8 mg/L 三个浓度的多杀菌素药液, 取新鲜无农药污染的甘蓝叶片擦拭干净后浸于药液中 10 s 后晾干, 处理后叶片分装于罐头瓶中并挑入甜菜夜蛾幼虫, 置于养虫室中饲养, 以没有浸药的甘蓝叶作为对照。按不同时间随机采集对照和存活的处理幼虫 20~30 头放在冰盘上, 用大头针固定, 剪开腹部并除去中肠, 留下表皮置于玻璃匀浆器中按每 mL 5 头加入预冷的 0.1 mol/L、pH 7.0 磷酸缓冲液 (PBS) 缓冲液, 在冰浴条件匀浆, 所得匀浆液于 12 000 g 离心 20 min, 其上清液即为待测的酶液。取 0.2 mol/L 邻苯二酚 1.5 mL, 0.05 mol/L、pH 6.8 PBS 1.5 mL, 0.1 mL 酶液于试管中混匀, 并于 25 °C 水浴中振荡反应 15 min, 于 420 nm 处测定 OD 值, 并测定酶液中蛋白质含量。酶活力以 $OD \cdot mg^{-1} \cdot pro \cdot min^{-1}$ 表示, 每处理重复 3 次。以酶活抑制率表示药剂对酶活力的影响, 酶活抑制率 (%) = (对照组酶活力 - 处理组酶活力) / 对照组酶活力 $\times 100$ 。

1.4.2 离体测定 取未施药的 4 龄幼虫同上提取酶液。先将多杀菌素配成适量浓度, 取一定量药液滴加在酶液中使最终反应液中多杀菌素浓度分别为 0.10×10^{-3} 、 1.0×10^{-2} 、0.5 mg/L。药剂与酶液于 25 °C 水浴中预反应 5 min, 再按与活体测定相同的方法加入邻苯二酚和 PBS 继续反应 15 min, 并分别测定计算 OD 值、酶液中蛋白质含量和酶活抑制率。

1.5 羧酸酯酶 (CarE) 活力测定

1.5.1 活体测定 参照 Van Asperen 的方法^[7]。试虫处理与 PPO 活性测定相似, 依据生测结果, 以亚致死剂量 0.05 mg/L 多杀菌素处理 3 龄幼虫。按不同时间分别取对照和处理的 3 龄存活幼虫置于玻璃匀浆器中按 10 头/mL 加入预冷的 0.1 mol/L、pH 7.0 PBS, 在冰浴条件下匀浆, 匀浆液于 12 000 g 离心 20 min, 收集上清液待测。反应液中含 0.01 mL 的酶液, 3.49 mL 0.04 mol/L 的磷酸缓冲液 (内含 10^{-7} mol/L 毒扁豆碱), 0.5 mL 4×10^{-4} mol/L 的 α -NA 液, 在 37 °C 水浴中保温 30 min, 加 0.5 mL 显色液, 室温下放置 10 min, 600 nm 处比色, 并测定酶液中蛋白质含量, 每个处理重复 3 次。以 α -萘酚作标准曲线, 根据标准曲线方程求得酶促反应生成的 α -萘酚量, 酶活力单位以 $\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot pro \cdot min^{-1}$ 表示。显色液的配制为 1% 固蓝 B 盐

与 5% SDS(十二烷基磺酸钠)溶液以体积比 2 : 5 混合, 现用现配。

1.5.2 离体测定 取未施药的 3 龄幼虫按与活体测定相同的方法提取酶液, 药剂与酶液的预处理方法和 PPO 离体测定相似, 再按与 CarE 活体测定相同的方法分别测定计算 OD 值、酶液中蛋白质含量和酶活抑制率。

1.6 酯酶同工酶电泳

参照张龙翔方法^[8]。采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳。分离胶质量分数为 7.5%, pH 8.9; 浓缩胶质量分数为 4%, pH 6.8; 电泳缓冲液 Tris-甘氨酸, pH 8.3。点样时依据酶液蛋白质含量取不同酶液并用蒸馏水补齐到相同体积, 加入到各小槽中以使各小槽中蛋白质含量相同。以质量分数为 0.04% 溴酚蓝作指示剂, 4 条件下, 浓缩胶电压 80 V、分离胶 160 V 进行电泳。整个过程约 4 h。凝胶染色液的配制为 α -NA 100 mg、 β -NA 100 mg、RR 盐 200 mg, 少量丙酮溶解, 加入 100 mL 0.1 mol/L (pH 7.0) PBS, 现用现配。染色约 10~15 min 后, 用蒸馏水冲洗胶板至蒸馏水无色。

1.7 蛋白质含量测定

参照 Bradford 考马斯亮蓝 G-250 法^[9]。

2 结果与分析

2.1 多杀菌素对甜菜夜蛾的毒力

结果如表 1 所示, 多杀菌素对甜菜夜蛾表现了很高的毒力, 其 LC₅₀ 值为 0.80 mg/L, 明显高于有机磷类药剂毒死蜱、氨基甲酸酯类药剂灭多威和苯并咪唑类药剂氟虫腈, 略高于昆虫生长调节剂氟啶脲和虫酰肼以及拟除虫菊酯类药剂高效氯氟氰菊酯, 与微生物杀虫剂 Bt 的毒力相近。用多杀菌素处理的试虫, 2~4 h 即可见肌肉收缩、全身颤抖、爬行不稳、头尾抱成一团等中毒症状。

Table 1 Toxicity of insecticides to the third instar larvae of beet armyworm

Insecticides	LC ₅₀ (95% CL) /mg · L ⁻¹	LC-P
spinosad	0.80 (0.35~1.83)	Y= 5.09+ 0.96X
Bt	1.00 (0.29~3.37)	Y= 5.00+ 0.76X
lambdacyhalothrin	2.43 (1.27~4.66)	Y= 4.47+ 1.37X
chlorfluazuron	5.75 (2.26~14.66)	Y= 3.94+ 1.40X
tebufenozide	6.81 (1.54~30.18)	Y= 4.26+ 0.84X
fipronil	22.86 (8.57~60.98)	Y= 3.44+ 1.15X
methomyl	34.23 (20.60~56.86)	Y= 2.59+ 1.58X
chlorpyrifos	90.20 (26.28~309.59)	Y= 2.57+ 1.24X

2.2 多酚氧化酶活性

结果如表 2 所示。离体条件下, 多杀菌素对甜菜夜蛾多酚氧化酶活力有明显抑制作用, 且表现为在一定浓度范围内, 随多杀菌素浓度增高抑制能力增强的趋势。1.0 × 10⁻³ mg/L 的多杀菌素对 PPO 活力的抑制率为 50.66%, 1.0 × 10⁻² mg/L 的抑制率为 62.67%, 0.5 mg/L 的则达到 67.76%。

活体条件下多杀菌素对甜菜夜蛾 PPO 的影响如表 3 所示, 不同时间下, 未处理的甜菜夜蛾体内 PPO 活力变化较小, 而处理试虫酶活有显著变化。0.1 mg/L 的多杀菌素处理 4 h 后, 其 PPO 活性相对于对照增加了 2.69 倍(抑制率为-168.61%); 12 h 后处理试虫酶活明显下降,

约为对照的 0.58 倍, 药剂对 PPO 的抑制率达到 40.51%; 24 h 抑制率为 23.21%。0.8 mg/L 多杀菌素处理的甜菜夜蛾, 其 PPO 活性在各个处理时间均低于 0.1 mg/L 处理, 与低浓度处理相似, 药剂处理 4 h 后, 处理试虫酶活高于对照, 而 12 h 后则显著低于对照。PPO 既是昆虫表皮鞣化的重要酶系, 也是其体内一种关键的防御酶。多杀菌素在不同时间对 PPO 活性呈现不同的影响可能正是与该酶的防御特性有关, 该杀虫剂能显著抑制 PPO 活性, 同时活体情况下诱导了害虫的防御反应, 导致了 PPO 活性的升高, 诱导作用与抑制作用两者之间相互作用的结果, 使 PPO 活性呈现特有的变化特征, 在多杀菌素处理的早期主要表现为诱导作用, 而在后期主要表现为抑制作用。

Table 2 Effect of spinosad on polyphenol oxidase (PPO) activity of beet armyworm *in vitro**

Concentration/mg · L ⁻¹	Activity [*] /OD · mg ⁻¹ pro · min ⁻¹	Inhibitory rate(%)
CK	1.52 ± 0.12 Aa	—
1.0 × 10 ⁻³	0.75 ± 0.06 Bb	50.66
1.0 × 10 ⁻²	0.58 ± 0.08 BCc	62.67
0.5	0.49 ± 0.05 Cc	67.76

* The capital and small letters within same columns show significant differences at 1% and 5% level, respectively. The following tables is as the same

Table 3 Effect of spinosad on PPO activity of beet armyworm *in vivo*

Concentration /mg · L ⁻¹	4 h		12 h		24 h	
	Activity [*]	Inhibitory rate(%)	Activity	Inhibitory rate(%)	Activity	Inhibitory rate(%)
CK	1.37 ± 0.07 Cc	—	1.58 ± 0.18 Aa	—	1.68 ± 0.04 Aa	—
0.1	3.68 ± 0.07 Aa	-168.61	0.94 ± 0.02 Bb	40.51	1.29 ± 0.15 Bb	23.21
0.25	1.63 ± 0.04 Bb	-18.98	0.89 ± 0.01 Bb	43.67	1.32 ± 0.06 Bb	21.43
0.8	1.52 ± 0.07 BCb	-10.95	0.81 ± 0.02 Bb	48.73	1.06 ± 0.01 Cc	36.90

* The unit of activity is OD · mg⁻¹pro · min⁻¹.

2.3 羧酸酯酶(CarE)活力测定

如表 4 所示, 离体条件下多杀菌素对甜菜夜蛾 CarE 基本上没有影响。尽管药剂处理试虫 CarE 活性略低于对照, 但其差异并不显著 ($P = 0.01$), 且与药剂的浓度没有任何关系。

活体条件下, 亚致死剂量的多杀菌素对 CarE 的影响如表 5 所示, 处理 2 h 后, 多杀菌素对虫体内 CarE 活性有显著诱导作用, 相对于对照, 处理试虫酶活性增加了 1.47 倍。处理后 8 h、16 h, 处理试虫与对照差异较小, 但药后 24 h, 处理组 CarE 活力显著增加, 相对于对照组, 其活性增加了 1.61 倍。

Table 4 Effect of spinosad on CarE activity of beet armyworm *in vitro*

Concentration /mg · L ⁻¹	Activity /μmol(α-naphthol) · mg ⁻¹ pro · min ⁻¹	Inhibite rate (%)
CK	4.17 ± 0.032 Aa	—
1.0 × 10 ⁻³	3.87 ± 0.127 Ab	7.19
1.0 × 10 ⁻²	3.92 ± 0.284 Ab	6.00
5.0 × 10 ⁻²	4.00 ± 0.064 Ab	4.08
1.0	3.99 ± 0.054 Ab	4.32

Table 5 Effect of spinosad on CarE activity of beet amywom *in vivo* at different time

Treatment time/h	A ctivity of control / $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro} \cdot \text{min}^{-1}$	A ctivity of treatment / $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro} \cdot \text{min}^{-1}$	Control/Treatment
2	3.08 ± 0.40	4.54 ± 0.45	1.47
8	2.86 ± 0.37	2.87 ± 0.01	1.00
16	5.02 ± 0.44	4.91 ± 0.61	0.98
24	4.36 ± 0.21	7.01 ± 0.28	1.61

2.4 酯酶同工酶电泳

从图 1 可以看出,甜菜夜蛾酯酶同工酶主要有 4 条谱带,且幼虫在发育过程中,其酯酶同工酶处于动态变化之中。如图中的 1、3、5、7、9 分别是对照试虫在 2、4、8、12 和 24 h 的同工酶谱,其中在 0~12 h 中,C、D 两带呈现加强的趋势,而 b 带 4 h 后则明显减弱,在 12 h 和 24 h 时几乎完全缺失,这可能与昆虫发育过程中不同的酯酶同工酶承担不同的生理功能有关。随着生理状态的变化(如脱皮等),昆虫相应地合成所需要的酶系;同样,从能量保守的角度出发,也相应地抑制暂时不需要的酶系,从而使甜菜夜蛾酯酶同工酶谱出现动态的变化,相同结果在其他研究中有较为详细的报道^[10]。

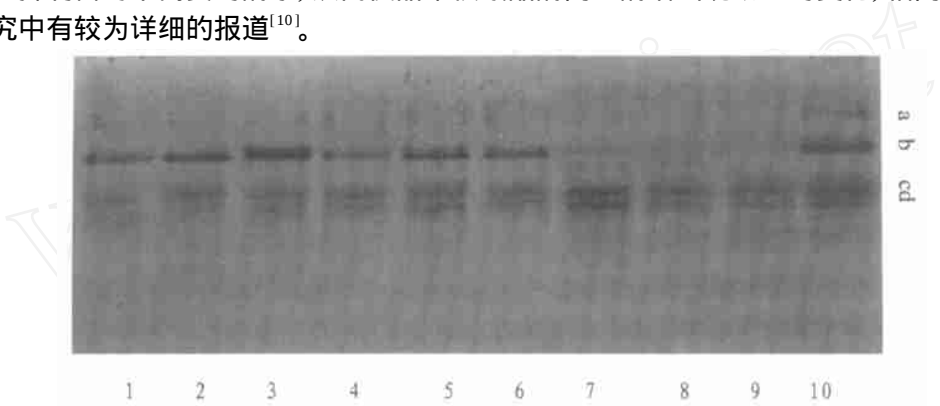


Fig 1 The Esterase isoenzymes PAGE of beet amywom

Columns 1, 3, 5, 7, 9 are controls, 2, 4, 6, 8, 10 are treatment Isoenzymes 1, 2 are a comparison between control and treatment after 2 h; the same as the isoenzymes 3, 4 after 4 h; isoenzymes 5, 6 after 8 h; isoenzymes 7, 8 after 12 h; isoenzymes 9, 10 after 24 h respectively.

多杀菌素处理甜菜夜蛾后,在不同时间,处理与对照试虫酯酶同工酶均存在着一定的差异,特别是药后 24 h,两者(第 9、10 条带)差异极为显著,处理试虫(第 10 条带)a、b 带较对照(第 9 条带)活性显著增加,多杀菌素对 CarE 的诱导作用在此时十分明显,这与活体条件下进行的活性测定结果相一致。

3 讨论

与一般生物杀虫剂不一样,多杀菌素对害虫表现了较强的速效性,药剂处理甜菜夜蛾 2~4 h 后,即出现肌肉收缩、全身颤抖、爬行不稳、头尾抱成一团等中毒症状,这可能与多杀菌素对害虫神经系统的 γ 氨基丁酸 A 型受体、乙酰胆碱受体等作用有关。

本研究结果表明,多杀菌素对 PPO 与 CarE 均有一定的作用,该杀虫剂既能抑制 PPO 的

活性, 同时又能诱导害虫产生防御反应, 导致该酶活性的升高; 对 CarE, 该杀虫剂仅具有诱导作用, 而没有抑制作用。

多酚氧化酶是由昆虫血细胞产生, 分布于昆虫表皮和血淋巴中的一种含铜蛋白质。昆虫不像脊椎动物那样具有完整的免疫系统, 它一般通过产生黑色素来抵御入侵的外来物。而 PPO 是昆虫体内黑色素合成的关键酶, 在昆虫免疫反应中起关键性的作用。通常情况下, 它以酚氧化酶原的形式存在于昆虫血淋巴中, 通过特异性丝氨酸蛋白酶级联反应被激活并有限水解生成有活性的 PPO^[11~13]。本研究中多杀菌素处理的试虫, 药后 4 h 其 PPO 活性相对于对照显著增加, 可能正是由于酚氧化酶原被激活的结果。但由于多杀菌素对 PPO 有较强的抑制作用, 在处理后期(12~24 h 后), 尽管药剂的诱导作用仍然存在, 但抑制与诱导两者相互作用的结果, 使前者明显处于主导地位, 导致 PPO 活性被抑制, 且随药剂浓度的增加其抑制作用增强。有关杀虫药剂对 PPO 的诱导作用^[14,15]和抑制作用^[16]在有关研究中已有一些报道。

PPO 既是昆虫表皮鞣化的重要酶系, 也是其体内一种关键的防御酶。多杀菌素通过对 PPO 的抑制, 将至少在两个方面对害虫发挥其毒理作用: 一方面, 表皮鞣化是害虫幼虫发育过程中新表皮形成的前提, 多杀菌素通过抑制表皮鞣化过程中的关键酶而抑制新表皮形成, 从而抑制昆虫正常的脱皮; 另一方面多杀菌素通过抑制黑色素的形成而破坏昆虫的免疫系统, 从而加速其死亡的过程。

CarE 是昆虫体内一种主要的代谢解毒酶, 该酶具有广泛的底物专一性和重叠性, 能催化水解脂肪族羧酸酯、芳酸酯及相应的硫代酯等多种化合物。同时, 害虫还可以通过大量产生该酶并与杀虫剂结合, 使杀虫剂在到达靶标位点之前被阻断或降解。有关农药对昆虫解毒酶系的影响已有过较多的报道。高希武等用含 20 mg/kg 莠去津的人工饲料饲养棉铃虫初孵幼虫, 至 3 龄幼虫时, 处理组活性增加 146.4%^[17]。夏冰等用阿维菌素与高效氯氰菊酯亚致死剂量处理阿维菌素敏感小菜蛾品系, 测得 CarE 对 α -NA、 β -NA 活性均比对照显著升高^[18]。钱华等用溴氰菊酯处理马尾松毛虫, 当药剂剂量为 5.0×10^{-7} μ g/头时, CarE 活性在 48 h 后达最高峰, 增加了 38.1%^[19]。本研究同样发现, 多杀菌素能诱导甜菜夜蛾 CarE 活性的增加, 药后 24 h, 处理试虫相对于对照组, 其活性增加了 1.61 倍, 多杀菌素对 CarE 的诱导作用势必降低其他易被 CarE 代谢药剂的活性, 因此在考虑多杀菌素与其他杀虫剂的轮用混用时, 必须注意相关药剂的理化特性。

参考文献:

- [1] Crouse G D, Sparks T C, Schoonover J, et al. Recent advances in the chemistry of spinosyns[J]. *Pest Manag Sci*, 2001, 57: 177-185
- [2] Thompson G D, Dutton R, Sparks T C. Spinosad a case study: an example from a natural products discovery programme [J]. *Pest Manag Sci*, 2000, 56: 696-702
- [3] Salgado V L, Sheers J J, Watson G B, et al. Studies on the mode of action of spinosad: the internal effective concentration and the concentration dependence on neural excitation[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1998, 60: 103-110
- [4] Watson G B. Action of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2001, 71: 20-28
- [5] Moulton J K, Pepper K D, Dennehy T J. Studies of resistance of beet armyworm to spinosad in field populations from South USA and Southeast Asia[A]. *Proceeding of Beltwide Cotton Conferences*[C]. Atlanta, GA, 1999. 884-888

- [6] Ishaaya I, Casida J E. Dietary TH 6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1974, 4: 484-490
- [7] Van Asperen K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method [J]. *Insect Physiol*, 1962, 8: 401-416
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法与技术 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1981, 94-111
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254
- [10] 张文吉, 张友军, 韩熏莱. 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 [J]. *植物保护学报*, 1996, 23(2): 157-162
- [11] Ashida M, Brey P T. Role of the integument in insect defense: Pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92: 10698-10702
- [12] Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, et al. Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: A copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92: 7774-7778
- [13] Jing H B, Wang Y, Kanost M R. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* esterase [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 12220-12225
- [14] 吴刚, 尚稚珍. 抑太宝对亚洲玉米螟表皮酚氧化酶及几丁质酶活力的影响 [J]. *昆虫学报*, 1992, 35(3): 306-311
- [15] 陈尚文, 杨振德. 马尾松毛虫和荔枝体内多酚氧化酶的初步研究 [J]. 1996, 3(2): 48-50
- [16] 李周直. 马尾松毛虫蛋白质、核酸酶和羧酸酯酶与耐药性的关系 [J]. 1993, 36(3): 296-301
- [17] 高希武, 梁同庭. 莠去津和敌敌畏对棉铃虫和家蝇羧酸酯酶以及 GSH-S-转移酶的诱导作用 [J]. *昆虫学报*, 1993, 36(2): 167-171
- [18] 夏冰, 石泰, 梁沛, 等. 杀虫剂亚致死剂量对小菜蛾羧酸酯酶的影响 [J]. *农药学报*, 2002, 4(1): 23-27
- [19] 钱华, 吴蓉, 左小明, 等. 马尾松幼虫血淋巴羧酸酯酶的诱导及其与抗菌物质的相关性研究 [J]. *浙江林业科技*, 1998, 18(6): 30-32

Effect of Spinosad on the Polyphenol Oxidase and Carboxyl Esterase in Beet Armyworm, *Spodopetera exigua* (Hübner)

WANG Guang-feng¹, ZHANG You-jun^{1*}, BAILI an-yang²,
WU Qing-jun¹, XU Bao-yun¹, ZHU Guo-ren¹

(1. Institute of Vegetables and Flowers, CAAS, Beijing 100081, China;

2. Plant Protection Academy, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: Effects of spinosad on the activities of polyphenol oxidase (PPO) and carboxyl esterase (CarE) in beet armyworm larvae were investigated. Spinosad showed high toxicity to the third instar larvae of beet armyworm and its LC_{50} was 0.80 mg/L . $1.0 \times 10^{-3} \sim 0.5 \text{ mg/L}$ spinosad inhibited PPO activities more than 50% *in vitro* and the high concentration showed stronger inhibitory activity. *In vivo* $0.1 \sim 0.8 \text{ mg/L}$ spinosad induced PPO activity increasing in 4 h and then inhibited its activity after 12 h. $1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \text{ mg/L}$ spinosad had no effect on CarE activity *in vitro* but which was significantly increased when the 3rd larvae was fed with leaves treated with 0.05 mg/L .

Key words: spinosad; beet armyworm; polyphenol oxidase; carboxyl esterase