

# 棉蚜不同品系羧酸酯酶的酶标仪 动力学测定研究

高希武<sup>①</sup> 郑润勇 宁世民 胡熯华 关成久 郑炳宗  
(昆虫系)

**摘要** 用分光光度计终点测定法和酶标仪动力学测定法对 3 个抗性水平不同的棉蚜品系和 1 个敏感品系的羧酸酯酶进行了研究。以  $\alpha$ -乙酸萘酯( $\alpha$ -NA)为底物时,敏感品系(S)和抗性品系 R1,R2,R3 终点测定法所需的最适酶量分别为 1/2,1/20,1/33 和 1/100 头蚜虫, $\beta$ -乙酸萘酯( $\beta$ -NA)为底物时分别为 1/3,1/20,1/33 和 1/100 头蚜虫。S 品系对  $\beta$ -NA 的水解活性明显高于  $\alpha$ -NA,而抗性品系相反,对  $\alpha$ -NA 的活性明显高于  $\beta$ -NA。对  $\alpha$ -NA 水解的活性在不同品系间差异较大(近 60 倍),而对  $\beta$ -NA 水解的活性差异小于对  $\alpha$ -NA,最大约为 14 倍。用酶标仪动力学测定法研究表明,4 个棉蚜品系间羧酸酯酶活性具有明显的差异,S,R1,R2 和 R3 分别为 38,85,198 和 762 mOD $\cdot$ min<sup>-1</sup> $\cdot$ 虫<sup>-1</sup>;与 4 个品系的抗性程度比较,酶动力学方法的测定结果更可靠。

**关键词** 羧酸酯酶;棉蚜;杀虫剂抗性

**中图分类号** S481.4

## Comparison of Carboxylesterase Activity Between Static Measuring Method and Kinetic Measuring Method in Various Strains of Cotton Aphid

Gao Xiwu Zheng Runyong Ning Shimin Hu Manhua Guan Chengjiu Zheng Bingzong  
(Dept. of Entomology)

**Abstract** Carboxylesterases of three resistant strains and one susceptible strain of cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover, were studied using the method of end measurement and the kinetic method. The amount of enzymes used in the method of end measurement was equal to 1/2 or 1/3 for S strain, 1/20 for R1 strain (low resistance), 1/31 for R2 strain (moderate resistance) and 1/100 aphid for R3 strain (high resistance) respectively using  $\alpha$ -naphthylacetate ( $\alpha$ -NA) or  $\beta$ -naphthylacetate ( $\beta$ -NA) as substrate. Specific activity of carboxylesterase was lower using  $\alpha$ -NA as substrate than using  $\beta$ -NA as substrate in S strain whereas specific activity was higher using  $\alpha$ -NA as substrate than using  $\beta$ -NA as substrate in resistant strains. R3 strain was 60 or 14 times as high as S strain in specific activity of carboxylesterase when  $\alpha$ -NA or  $\beta$ -NA was used as substrate. The results obtained by ki-

收稿日期: 1996-04-08

<sup>①</sup>高希武,北京海淀圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区) 100094

netic method showed that the various strains of cotton aphids differed significantly in specific activities of carboxylesterase and the values of carboxylesterase activities of S, R1, R2 and R3 strains were 38, 85, 198 and 762 mOD·min<sup>-1</sup> aphid<sup>-1</sup> respectively. The specific activities of carboxylesterase were directly proportional to the levels of pyrethroid resistance in cotton aphids. The kinetic method of carboxylesterase measurement for monitoring pyrethroid resistance was more accurate than the method of end measurement.

**Key words** carboxylesterase; *Aphis gossypii*; insecticide resistance

目前,许多国家和地区的棉蚜已经对拟除虫菊酯、有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂产生了不同程度的抗性<sup>[1~6]</sup>。及时了解掌握棉蚜的抗药性发展状况,正确选择药剂、调整防治策略、控制抗性发展是非常重要的。传统的抗性监测方法多采用生物测定法,它不仅需要大量试虫,且费时较多。因此,寻找一条简便、快速的抗性监测方法极为必要。作者在1988~1991年间就报道了北京及河北北部地区瓜棉蚜的抗药性状况、抗药性机制以及抗药性的生物化学监测方法等<sup>[1~3,7]</sup>。当时提出用分光光度计终点测定法测定瓜棉蚜羧酸酯酶的活性来估计种群的抗药性水平,该方法是以瓜棉蚜羧酸酯酶与底物反应15 min后生成的产物量来计算酶的比活力<sup>[7]</sup>,后来进一步研究发现有些抗性个体的线性反应时间低于15 min,给测定结果带来一定的误差。于是我们研究了用酶标仪动力学方法测定羧酸酯酶活性来预测棉蚜种群的抗药性及其发展。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试虫源

敏感品系(81-171B)由英国洛桑试验站 Devonshire 教授提供;R1,R2 和 R3 分别采自木槿、黄瓜和棉花,经单头孤雌生殖培养而成。抗性程度分别为低抗、中抗和高抗。

### 1.2 供试药剂

$\alpha$ -乙酸萘酯( $\alpha$ -NA)和 $\beta$ -乙酸萘酯( $\beta$ -NA)分别为上海试剂一厂和北京中西化工厂产品。固蓝B盐和固蓝RR盐为Fluka公司产品。十二烷基硫酸钠(SDS)为Sigma公司产品,中国医药公司分装。其他试剂均为分析纯,国产。

### 1.3 羧酸酯酶测定方法

**1.3.1 分光光度计终点测定法** 参照高希武和郑炳宗方法<sup>[1,7]</sup>。

**1.3.2 酶标仪动力学测定法** 1头蚜虫放在酶标板穴中,加50  $\mu$ L 0.2 mol·L<sup>-1</sup>,pH 6.0的磷酸盐缓冲液匀浆,然后加入100  $\mu$ L  $\alpha$ -NA和固蓝RR盐混合液,在JGQ-Mol型酶标仪每隔30 s(敏感品系)或10 s(抗性品系)读一次光密度值,直到5分(敏感品系)或1分(抗性品系)。然后将时间与光密度值作图,求出线性部分的斜率,即以反应的初速度值作为酶活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同品系棉蚜对 $\alpha$ -NA和 $\beta$ -NA的活性比较

对于分光光度计终点测定法来讲,影响准确度的人为可以控制的因素主要是反应时间和酶量,在合适的线性反应时间内,调整酶的浓度使光密度值控制在0.4~0.6之间。表1显

示出不同棉蚜品系最适的酶量,抗性品系和敏感品系有明显差异,S 品系为 1/3~1/2 头蚜虫,而 R3 品系达到了 1/100 头。

棉蚜的不同抗性品系羧酸酯酶对  $\alpha$ -NA 的水解活性和  $\beta$ -NA 的水解活性具有明显的相关性(图 1),相关系数为 0.95( $n=400$ )。S 品系对  $\alpha$ -NA 的活性明显低于对  $\beta$ -NA 的活性;而抗性品系对  $\alpha$ -NA 的活性则与敏感品系相反,高于对  $\beta$ -NA 的活性。

### 2.2 棉蚜羧酸酯酶不同品系和不同测定方法比较

表 2 显示出 4 个棉蚜品系用两种方法测定的羧酸酯酶平均比活力的比较。终点测定法和动力学方法均显示出 R1,R2 和 R3 品系的羧酸酯酶的比活力明显高于 S 品系,但终点测定法不能区别低抗和中抗种群,R1 和 R2 酶活性没有明显差异, $\alpha$ -NA 为底物时分别为 1 172 和 1 236  $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\beta$ -NA 为底物时分别为 968 和 887  $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,而动力学测定法则可明显区别低抗(R1)和中抗(R2)种群,比活力分别为 85 和 198  $\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{虫}^{-1}$ 。说明动力学方法更适合于抗性的监测。

表 1 用终点测定法测定棉蚜不同品系羧酸酯酶活性酶量比较

品系	$\alpha$ -NA 羧酸酯酶	$\beta$ -NA 羧酸酯酶
S	0.5	0.3
R1	0.05	0.05
R2	0.03	0.03
R3	0.01	0.01

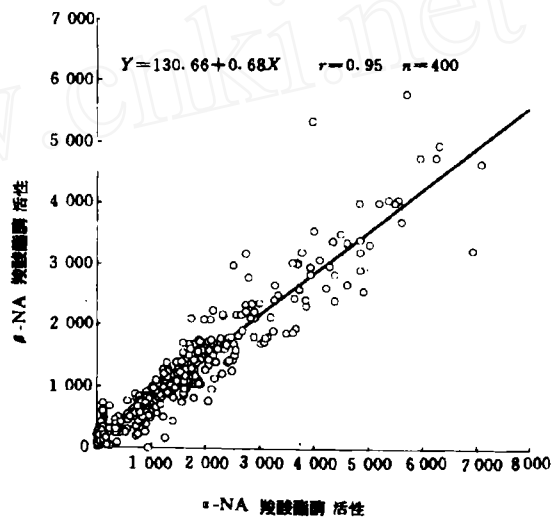


图 1 棉蚜  $\alpha$ -NA 和  $\beta$ -NA 羧酸酯酶活性相关关系

表 2 棉蚜羧酸酯酶不同品系和不同测定方法比较\*

品系	终点测定法		动力学测定法 ( $\alpha$ -NA)
	$\alpha$ -NA	$\beta$ -NA	$\alpha$ -NA
S	57.10A	213.79A	38.42A
R1	1171.69B	968.37B	85.27B
R2	1236.14B	887.36B	198.14C
R3	3293.00C	3022.28C	762.25D

每一品系为 100 次以上测定的平均值,单位为  $\mu\text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;动力学测定法为  $\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{aphid}^{-1}$ 。每一列中数字后面字母不同者为达到极显著差异。

### 2.3 棉蚜不同品系羧酸酯酶个体频率分布

根据敏感品系的活性分布,将敏感品系中 100%或接近 100%个体羧酸酯酶活性均小于

某一确定的值作为标准,观察抗性品系个体的分布状况,结果见表3。终点测定法以羧酸酯酶活性  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  为标准,S品系中水解  $\alpha\text{-NA}$  和  $\beta\text{-NA}$  的活性小于  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  的个体分别为 100 和 97%,与 R3 高抗品系中为 0 很容易区别,但是对于低抗与中抗品系就很难区别,分别为 8.83 和 11.76% ( $\alpha\text{-NA}$ ) 以及 12.75 和 22.77% ( $\beta\text{-NA}$ )。以  $\beta\text{-NA}$  为底物时 R1 和 R2 羧酸酯酶活性的个体频率分布与实际抗性情况差距较大,说明终点测定法只能区别抗生程度高的种群;而动力学测定法则与抗性的实际情况完全吻合,以羧酸酯酶活性  $80 \text{mOD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{虫}^{-1}$  为标准,在敏感品系(S)、低抗(R1)、中抗(R2)和高抗(R3)品系中小于  $80 \text{mOD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{虫}^{-1}$  的个体频率分别为 100,35,6 和 0。因此,用动力学方法测定羧酸酯酶活性监测棉蚜的抗药性更能反应实际情况,比终点测定法更为准确。

以  $\alpha\text{-NA}$  作为底物时,终点测定法和动力学测定法得到的羧酸酯酶比活力平均值具有明显的相关性,相关系数为  $0.96(y = -70.85 + 0.24x)$ 。但是,用动力学测定法代替终点测定法可以提高检测的准确性和灵敏度。

表3 棉蚜不同品系羧酸酯酶个体频率分布\*

品系	个体频率(终点测定法)		个体频率(动力学测定法)
	$\alpha\text{-NA}$	$\beta\text{-NA}$	$\alpha\text{-NA}$
S	100	97.00	100
R1	8.83	12.75	35.00
R2	11.76	22.77	6.00
R3	0	0	0

\* 终点测定法为小于  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  的个体频率;动力学法为  $80 \text{mOD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{虫}^{-1}$  的个体频率。

### 3 讨论

许多研究证明了棉蚜的抗药性程度与羧酸酯酶的活性具有正的相关性<sup>[1,7-10]</sup>,并有人提出用羧酸酯酶活性的变化来监测棉蚜的抗药性,不少作者用羧酸酯酶活性监测害虫抗药性多采用分光光度法、滤纸法和醋酸纤维薄膜法<sup>[11,12]</sup>,这些方法尽管简单,但很难检测抗性发展初期(即低抗)的种群,往往在检测到时,抗性已经很高,失去了指导抗性治理的意义。动力学方法既简单又方便,比以前的方法准确性和检测灵敏度均有所提高。如果用全自动酶标仪几分钟之内就可以测定 96 个样本,即使用普通酶标仪其速度也大大超过分光光度法,同时又可以节省试剂(酶标仪动力学法反应总体积仅  $150\sim 250 \mu\text{L}$ ,分光光度法至少  $1\sim 3 \text{mL}$ )。

羧酸酯酶活性会因寄主植物的不同而有差异<sup>[13,14]</sup>,最好采回样本后在室内用标准寄主植物饲养一段时间再行测定。田间种群的异质性较大,因此采集样本数量要足够多,同时要注意从不同的植株采集,以便能充分反映种群的羧酸酯酶特征。测定时选择虫体的标准也应一致,一般用无翅雌成蚜,测定的数量尽可能多。另外就是注意选择体色要能尽量反应种群的总体特征,这是因为不同体色的棉蚜羧酸酯酶活性有所不同<sup>[15]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 郑炳宗,高希武,王政国,曹本钧. 北京及河北省北部瓜-棉蚜对拟除虫菊酯抗药性的研究初报. 植物保护学报,1988,15:55~61
- 2 郑炳宗,高希武,王政国,梁同庭,曹本钧,高洪. 瓜-棉蚜对有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂抗生机制研究. 植物保护学报,1989,16:131~138
- 3 高希武,郑炳宗,梁同庭,曹本钧. 杀虫剂混用或加增效剂对瓜-棉蚜增效作用及机制研究. 植物保护学报,1989,16:273~278
- 4 O'Brien P S, Graves J B. Insecticide resistance and reproductive biology of *Aphis gossypii* Glover. Southwest Entomol 1992, 17:115~122
- 5 Hollingsworth R G, Tabashnik B E, Ullman D E, Johnson M W, Messing R. Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to insecticide in Hawaii: Spatial patterns and relation to insecticide use. J Econ Entomol, 1994, 87:293~300
- 6 Saito T. Insecticide resistance of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). II. Occurrence of pyrethroids resistant populations. Jap J Appl Entomol Zool, 1990, 34:174~176
- 7 高希武,郑炳宗. 生物化学法监测瓜-棉蚜田间种群的抗药性. 植物保护学报,1990,17:373~377
- 8 孙耘芹,冯国蕾,张桂林,龚坤元. 棉蚜对有机磷杀虫剂抗性的生化机制. 昆虫学报,1987,30:13~19
- 9 Saito T. Insecticide resistance of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) IV Qualitative variations of aliesterase activity. Appl Entomol Zool, 1993, 28:263~265
- 10 Suzuki K, Hama H, Konno Y. Carboxylesterase of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), responsible for fenitrothion resistance as a sequestering protein. Appl Entomol Zool, 1993, 28:439~450
- 11 Marullo R, et al. Quick detection of resistant phenotypes with high esterase activity in two species of aphids (Homoptera: Aphididae). J Appl Ent, 1988, 106:212~214
- 12 Pasteur N, Georghiou G P. Filter paper test for rapid determination of phenotypes with high esterase activity in organophosphate-resistant mosquitoes. Mosq News, 1981,41:181~183
- 13 高希武. 寄主植物对棉蚜羧酸酯酶活性的影响. 昆虫学报,1992,35:267~272
- 14 Hosoda A, Hama H, Suzuki K, Ando Y. Insecticide resistance in cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). I. Aliesterase activity and organophosphorus-susceptibility of populations on eggplants and cucumber. Jap J Appl Entomol Zool, 1992, 36:101~111
- 15 高希武,郑炳宗. 不同体色瓜蚜耐药性差异及其生化机制. 植物保护学报,1991,18:181~185