

氟铃脲对斜纹夜蛾酚氧化酶活性的影响

焦艳艳, 刘永杰*, 邱秀翠, 刘 辉

(山东农业大学植物保护学院, 山东泰安, 271018)

摘要:【目的】探讨氟铃脲对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 酚氧化酶活性的影响。【方法】应用酶动力学法, 在确定斜纹夜蛾酚氧化酶最适反应条件基础上, 测定氟铃脲与酚氧化酶直接作用及氟铃脲处理幼虫后酚氧化酶的活性。【结果】以邻苯二酚为底物, 斜纹夜蛾酚氧化酶的最适 pH 6.5, 最适温度 30℃。氟铃脲没有和酚氧化酶结构中的铜离子结合, 而是直接与酶蛋白发生作用。氟铃脲浓度低于 1 153 mg/L 对离体酚氧化酶有激活作用, 在 138 mg/L 激活作用最大, 浓度高于 1 153 mg/L 则产生抑制作用。用 46 mg/L 和 92 mg/L 亚致死剂量氟铃脲连续处理 5 龄幼虫不同时间后, 酚氧化酶活性均显著提高, 且高浓度的激活作用大于低浓度的激活作用。进一步测定药剂处理幼虫 24, 48 和 72 h 的血淋巴、表皮和头部酚氧化酶活性, 随着氟铃脲处理时间延长, 两个剂量的氟铃脲对血淋巴、表皮及头部酚氧化酶的激活作用逐渐增大, 氟铃脲对血淋巴酚氧化酶的激活作用最大, 表皮次之, 头部最低。氟铃脲处理幼虫后, 其预蛹和蛹酚氧化酶的活性也显著提高, 表现出一定的后效应。【结论】一定浓度范围内, 氟铃脲对斜纹夜蛾酚氧化酶具有激活作用。

关键词: 斜纹夜蛾; 昆虫生长调节剂; 氟铃脲; 酚氧化酶; 酶激活

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)05-0517-08

Effects of hexaflumuron on phenoloxidase activity in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae)

JIAO Yan-Yan, LIU Yong-Jie*, QIU Xiu-Cui, LIU Hui (College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of hexaflumuron on phenoloxidase (PO) activity in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) larvae. 【Methods】The activities of phenoloxidase directly reacted *in vitro* with hexaflumuron and that from hexaflumuron-treated 5th instar larvae of *S. litura* were assayed with enzyme kinetics methods. 【Results】The optimum reaction conditions of PO were pH 6.5 and best working temperature 30℃ by using catechol as substrate. Hexaflumuron could directly combine with enzyme protein, but it was not chelated with Cu^{2+} in the active center of PO. The PO activity *in vitro* increased when hexaflumuron concentrations were below 1 153 mg/L, reached its highest level at 138 mg/L and was inhibited above 1 153 mg/L. After the 5th instar larvae were continuously treated with two sublethal concentrations (46 mg/L and 92 mg/L) of hexaflumuron for different time, the PO activity was significantly higher than that of the control at the same treatment time and the activation rates at high concentrations were larger than that at low concentrations. The PO activity in the hemolymph, cuticle and head of the 5th instar larvae increased with treatment time. The activation rate of PO at the same treatment time was the highest in the hemolymph and the lowest in the head. After the 5th instar larvae were continuously treated with hexaflumuron, PO activities in prepupae and pupae were also significantly enhanced. 【Conclusions】Hexaflumuron can activate phenoloxidase activity in *S. litura*.

Key words: *Spodoptera litura*; insect growth regulator; hexaflumuron; phenoloxidase; enzyme activation

上世纪 70 年代开始发展起来的苯甲酰脲类昆虫生长调节剂, 因其独特的作用机理和高效、低毒、安全等特点而受到特别重视。目前灭幼脲

(chlorenzuron)、除虫脲 (diflubenzuron)、氟啶脲 (chlorfluazuron)、氟虫脲 (flufenoxuron) 及氟铃脲 (hexaflumuron) 等多个重要品种常被用来防治鳞翅

基金项目: 山东省“十一五”科技攻关项目(2008GG10009032); 教育部留学基金项目

作者简介: 焦艳艳, 女, 1984 年 7 月生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫毒理学, E-mail: chili1028@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lyj@sdaa.edu.cn

收稿日期 Received: 2009-08-28; 接受日期 Accepted: 2010-04-26

目、鞘翅目、同翅目及双翅目等重要农林和卫生害虫,特别是用来防治对有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗药性的害虫作用更加突出(周忠实等, 2003; Unsal *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2008)。此类杀虫剂的作用机理研究也在不断深入。最早对灭幼脲作用机理的研究发现,灭幼脲通过抑制几丁质合成或沉积,阻止新表皮形成,使昆虫因不能正常脱皮而死亡(Post *et al.*, 1974; Soltani *et al.*, 1984)。进一步研究证实,灭幼脲等还可干扰昆虫体内保幼激素和蜕皮激素平衡(Yu and Terriere, 1975; 龚国玑等, 1989; 周保华等, 1991)及激活几丁质酶和酚氧化酶活性(Ishaaya and Yablonski, 1976; 吴刚和尚稚珍, 1992; Bayoumi *et al.*, 1997)等。此类杀虫剂的作用机理比较复杂,到目前为止还不完全清楚。

酚氧化酶在昆虫表皮形成和免疫系统中具有重要作用。在昆虫新表皮形成过程中,酚氧化酶参与表皮的硬化和黑化过程,催化黑色素和多酚化合物的形成。酚氧化酶将酪氨酸羟化,产生 L-多巴,再将 L-多巴氧化成多巴醌,进而生成一系列引起黑化的色素类物质(Hiruma and Riddiford, 2009)。在昆虫内源免疫系统中,酚氧化酶可将血淋巴中的酚氧化成醌,在其他酶促条件下形成的黑色素对入侵病原物等有毒杀作用(Yin *et al.*, 2001; Brown and Gordon, 2005)。研究证实灭幼脲和氟啶脲可提高家蝇 *Musca domestica* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 表皮酚氧化酶的活性,认为酚氧化酶活性提高干扰了新表皮的正常形成,是导致幼虫死亡的重要原因之一(Ishaaya and Casida, 1974; 吴刚和尚稚珍, 1992)。但此类药剂对昆虫体内酚氧化酶活性影响变化过程及其后效应尚未有报道。本研究以斜纹夜蛾为试验材料,通过测定氟铃脲对 5 龄幼虫离体酚氧化酶的作用特点,探讨用氟铃脲处理后幼虫在不同时间、不同组织及预蛹和蛹酚氧化酶活性的变化,明确氟铃脲对酚氧化酶活性的影响,为深入研究该类药剂的作用机理,开发环境友好、高效、安全的新杀虫剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试斜纹夜蛾

由江苏省农业科学院植物保护研究所提供,在室内未接触任何药剂情况下用人工饲料(陈其津等, 2000)继代饲养,收集 5 龄幼虫供试验用。饲

养条件为 $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $\text{RH} = 75\%$, 光周期为 14L:10D 的光照培养箱。

1.2 供试药剂和试剂

98.5% 氟铃脲原药(美国陶氏益农公司生产,上海惠光化学有限公司分装),邻苯二酚(天津市科密欧化学试剂有限公司产品),磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化铜(天津市凯通化学试剂有限公司产品),考马斯亮蓝 G-250 (Sigma 产品),二甲基亚砜(DMSO) (Sigma 产品),丙酮等其他试剂均为国产分析纯。

1.3 氟铃脲处理幼虫方法

将氟铃脲原药先用少许 DMSO 溶解,再用丙酮液(丙酮:去离子水 = 0.2:1)配制成一定浓度的母液备用。根据氟铃脲对本实验用斜纹夜蛾 5 龄幼虫毒力测定结果(LC_{50} 为 441.82 mg/L),选用 46 mg/L (LC_{16}) 和 92 mg/L (LC_{26}) 浓度氟铃脲药液作为亚致死剂量。将人工饲料切成约 1 cm^3 小方块,分别浸入 46 mg/L 和 92 mg/L 氟铃脲药液中 30 s,取出晾干后放入指形管中备用。相同溶剂含量溶液浸泡饲料作为对照。每个处理取脱皮后 4~12 h 生长发育一致的 5 龄幼虫 200 头,饥饿 2 h 后,每个指形管中分别放入 1 头幼虫。每天更换一次浸过药的人工饲料,直至幼虫化蛹。每处理重复 3 次。幼虫饲养和蛹保存条件同上。

1.4 酚氧化酶活力测定方法

参照高兴祥等(2004)的方法提取酶液。取斜纹夜蛾 5 龄幼虫,按 5 mL/g 的比例加入预冷的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5),在冰浴中匀浆,于 4°C 冰箱内静置 30 min 后抽提。抽提液在 4°C 、10 000 g 条件下离心 30 min,取上清液供酶活力测定用。

参照 Sugumaran 和 Nellaippan(2000)的方法测定酶活力。采用磷酸缓冲体系。在 3 mL 测活体系中含有 2 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)、0.8 mL 37.5 mmol/L 邻苯二酚和 0.2 mL 酶液。反应在 30°C 恒温条件下进行。使用 UV-2450 型紫外分光光度计在 420 nm 处测定 120 s 内光密度随时间变化的增长曲线,每 20 s 记录一个吸光度值,得出一条直线,从直线的斜率求得该酶活力。以每分钟催化底物氧化吸光度提高 0.01 定义为 1 个酶活力单位(U)。各实验均重复 3 次,下同。

1.5 酚氧化酶基本特性测定

1.5.1 pH 值对酚氧化酶活力及稳定性影响: 配制不同 pH 值的缓冲溶液: 0.1 mol/L 柠檬酸-

0.1 mol/L 柠檬酸钠 (pH 3.0 ~ 5.0) 和 0.1 mol/L NaH_2PO_4 -0.1 mol/L Na_2HPO_4 (pH 6.0 ~ 8.0)。在 3 mL 活性测定体系中, 加入不同 pH 的缓冲液 2 mL, 再加入 0.8 mL 37.5 mmol/L 邻苯二酚。置于 30℃ 水浴 30 min 后, 加入 0.2 mL 酶液, 测定不同 pH 下酚氧化酶的活力。取 2 mL 不同 pH 值的缓冲液与 0.2 mL 酶液混合, 置于 30℃ 水浴 30 min 后, 再加入 0.8 mL 37.5 mmol/L 邻苯二酚, 于室温下反应, 测定不同 pH 值下酚氧化酶的稳定性。

1.5.2 温度对酚氧化酶活力及稳定性影响: 预先将 2 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.5, 下同) 与 0.8 mL 37.5 mmol/L 邻苯二酚在不同温度 (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55℃) 下保温 30 min, 再分别加入 0.2 mL 酶液, 测定不同温度下酚氧化酶的活力。将酶液在上述不同温度下预热 10 min 后, 取 0.2 mL 分别与 2 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液和 0.8 mL 37.5 mmol/L 邻苯二酚在室温下混匀, 测定不同温度下酚氧化酶的稳定性。

1.6 铜离子 (Cu^{2+}) 和酶液对氟铃脲最大吸收波长影响

参照肖婷等 (2007) 的方法, 略有改进。将氟铃脲原药用少许 DMSO 溶解后, 用丙酮液 (丙酮: 去离子水 = 0.2:1) 配制成一定浓度的母液备用。测定 Cu^{2+} 对氟铃脲最大吸收波长影响的溶液体系含有 1 mL 0.6 mmol/L CuCl_2 溶液、1 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液和 1 mL 1 mmol/L 氟铃脲溶液, Cu^{2+} 在测定体系中的终浓度为 0.2 mmol/L。测定酶液对氟铃脲最大吸收波长影响的溶液体系含有 0.2 mL 酶液、1.8 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液和 1 mL 1 mmol/L 氟铃脲溶液。对照体系含有 2 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液和 1 mL 1 mmol/L 氟铃脲溶液。在 30℃ 恒温水浴中稳定 5 min 后, 用紫外分光光度计扫描最大吸收峰。在测活体系中 DMSO 浓度要小于 3%, 以消除其对酶活力的影响。

1.7 氟铃脲对酚氧化酶活力影响

1.7.1 氟铃脲对未处理幼虫酚氧化酶活力影响: 取未用氟铃脲处理的生长发育一致的 5 龄幼虫 (1 d) 6 ~ 8 头, 称重后整体匀浆制备酶液。在 3 mL 测活体系中, 加入 1.9 mL 磷酸缓冲液, 固定底物邻苯二酚浓度 (0.8 mL, 37.5 mmol/L) 和加入酶液量 (0.2 mL), 再分别加入 0.1 mL 不同浓度 (0 ~ 13 833 mg/L) 的氟铃脲溶液, 测定氟铃脲对酚氧化酶活力的影响。酚氧化酶活力测定方法同 1.4, 下同。

1.7.2 氟铃脲处理幼虫不同时间酚氧化酶活力: 从两个亚致死剂量处理的幼虫中每隔 12 h 各取生长发育一致的 5 ~ 6 头幼虫, 至 72 h 共取 6 次。供试幼虫称重后用预冷的磷酸缓冲液清洗并在冰盘上用匀浆器整体匀浆, 匀浆液转移到预冷的离心管中, 加入磷酸缓冲液, 在 4℃、10 000 g 条件下离心 30 min 后, 取上清液用作待测酶液。以相同溶剂含量处理的相应时间的幼虫酶液作为对照。

1.7.3 氟铃脲处理对幼虫不同组织酚氧化酶活力影响: 分别于 24, 48 和 72 h 从两个亚致死剂量处理的幼虫中各取生长发育一致的 5 ~ 6 头幼虫, 供提取不同组织酚氧化酶酶液用。参照 Wappner 等 (1995) 的方法提取血淋巴、头部和表皮中的酚氧化酶酶液。在冰盘上用昆虫针自幼虫腹足处刺破, 随即用毛细管对准伤口处吸取血淋巴 0.5 ~ 1 mL, 放入预冷的离心管中。加入预冷的 5 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液, 在 4℃、10 000 g 下离心 30 min, 取上清液作待测酶液。将吸取血淋巴后的 5 龄幼虫放在冰盘上解剖。除去虫体表皮内外附着物, 剪下头部。将头部和表皮用去离子水清洗干净, 各自取约 1 g, 分别放入预冷的玻璃匀浆器中, 加入 5 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 在冰浴中匀浆。匀浆液转入预冷的离心管中, 在相同条件下离心, 取上清液作待测酶液。以相同溶剂含量处理的相应时间的幼虫不同组织酶液作为对照。

1.7.4 氟铃脲对预蛹和蛹酚氧化酶活力影响: 用两个亚致死剂量处理的人工饲料继续饲喂 5、6 龄幼虫至停止取食并化蛹。分别取大小一致的预蛹前期、预蛹及化蛹后 1, 3, 5, 8 d 的蛹 3 ~ 4 头, 选取的预蛹和蛹用预冷的磷酸缓冲液清洗后在冰盘上用匀浆器整体匀浆, 匀浆液转移到预冷的离心管中, 加入磷酸缓冲液, 在 4℃、10 000 g 条件下离心 30 min 后, 取上清液作待测酶液。以相同溶剂含量处理的相应时间的预蛹和蛹的酶液作为对照。预蛹前期为不取食, 头部变小, 虫体开始收缩的老熟幼虫, 预蛹为进入预蛹期 12 h 的个体。

1.8 蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法 (Bradford, 1976), 以牛血清蛋白 (BSA) 为标准蛋白。

1.9 数据处理与分析

采用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行 t-测验和单因素方差分析。根据每隔 20 s 记录的数据计算酚氧化酶的活性, 求出每一重复的平均酶活性, 最后用同一浓度 3 次重复试验的平均值进行不同处理

间的差异显著性比较($P=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 pH 值和温度对斜纹夜蛾幼虫酚氧化酶活性及稳定性的影响

以邻苯二酚为底物,测定在不同 pH 值缓冲液中斜纹夜蛾酚氧化酶的活性。结果表明,在 pH 5.0~6.5 之间,酶活性随着 pH 值升高而增加;当 pH 6.5 以上时,酶活性随 pH 值升高而快速下降。稳定性实验表明,在 pH 6.5 时酶的稳定性最好(图 1: A)。斜纹夜蛾酚氧化酶的最适 pH 值为 6.5。

以邻苯二酚为底物,在 20~30℃ 之间,酶活性随着温度的升高而增加;高于 30℃ 时,酶活性则随温度升高而下降。将酶液在不同温度下预热 10 min 后,在 20~40℃ 范围内表现出较高的稳定性,其中 30℃ 时最稳定,仍保留原有酶活性的 92.2%;温度在 40℃ 以上,酶活性快速下降(图 1: B)。30℃ 是斜纹夜蛾酚氧化酶的最适温度。

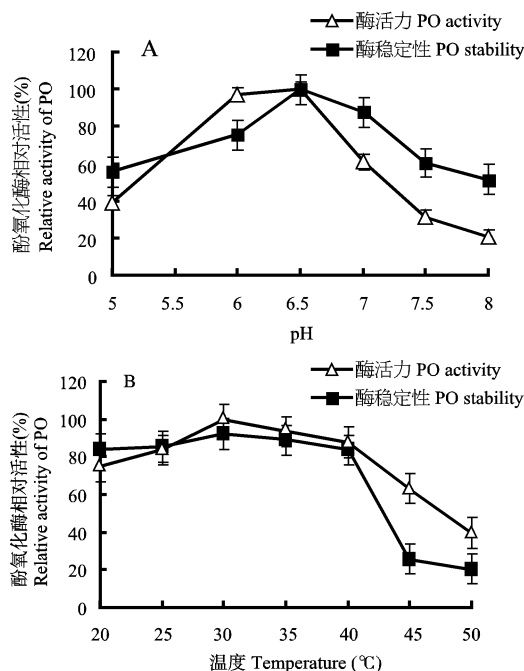


图 1 pH 值(A)和温度(B)对斜纹夜蛾幼虫酚氧化酶活性及稳定性的影响

Fig. 1 Effects of pH (A) and temperature (B) on the activity and stability of phenoloxidase of *Spodoptera litura* larvae

2.2 Cu^{2+} 和酶液对氟铃脲最大吸收峰的影响

为明确氟铃脲是否可以直接影响斜纹夜蛾酚氧化酶结构中的铜离子,在氟铃脲溶液中分别加入

Cu^{2+} 和酶液后,观察紫外吸收峰的变化。由图 2 可以看出,氟铃脲在 225 nm 处的最大紫外吸收峰没有发生明显偏移或消失,表明氟铃脲没有与酚氧化酶结构中的铜离子结合,说明氟铃脲不是通过影响酶结构中的铜离子发生作用。

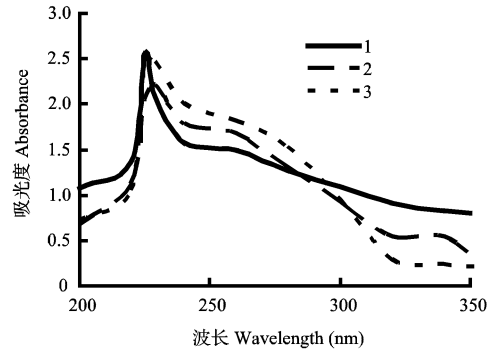


图 2 加入 Cu^{2+} 和酚氧化酶液后氟铃脲的紫外吸收光谱

Fig. 2 UV-visible spectrum of hexaflumuron mixed with Cu^{2+} and PO solution

曲线 1 为氟铃脲扫描曲线 Curve 1 was the UV-visible spectrum of hexaflumuron; 曲线 2 为加入 Cu^{2+} 后氟铃脲扫描曲线 Curve 2 was the UV-visible spectrum of hexaflumuron with Cu^{2+} ; 曲线 3 为加入酚氧化酶后氟铃脲扫描曲线 Curve 3 was the UV-visible spectrum of hexaflumuron with PO solution.

2.3 氟铃脲对斜纹夜蛾未处理幼虫酚氧化酶活性的影响

以邻苯二酚为底物,对照酶活性为 100%,测定并比较了氟铃脲系列浓度对斜纹夜蛾酚氧化酶活性的影响。从图 3 可以看出,氟铃脲浓度在 0~138 mg/L 时,酚氧化酶活性随着氟铃脲浓度增大而升高。此后,随着氟铃脲浓度继续增大,酶活性呈下降趋势。当氟铃脲浓度大于 1 153 mg/L 时,酶活性低于对照,表现为抑制作用。氟铃脲浓度在 0~1 153 mg/L 之间,酶活性均高于对照,氟铃脲在此浓度范围内对斜纹夜蛾酚氧化酶具有激活作用。

2.4 氟铃脲处理不同时间后斜纹夜蛾幼虫酚氧化酶活性的变化

用两个亚致死剂量氟铃脲处理的人工饲料连续饲喂 5 龄幼虫,每隔 12 h 测定一次酚氧化酶活性。结果表明:用两个剂量处理幼虫的酚氧化酶活性均显著高于对照,且随着药剂处理时间延长,氟铃脲的激活作用也逐渐增强。高剂量氟铃脲的激活作用高于低剂量的激活作用,如至 72 h 时,46 mg/L 浓度处理幼虫酚氧化酶活性提高了 95.0%,92 mg/L 浓度提高了 105.2% (图 4)。

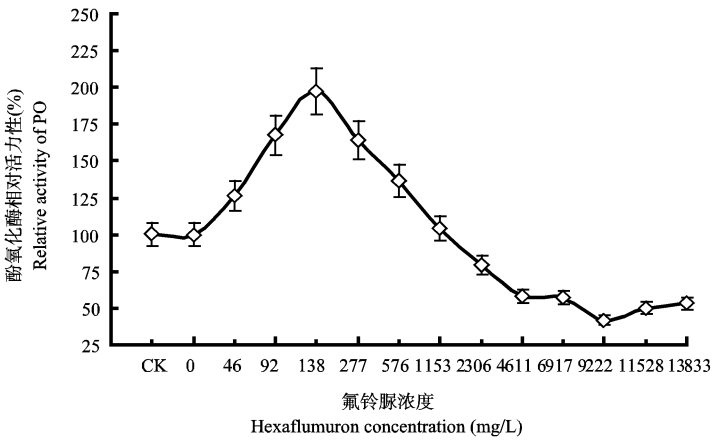


图3 氟铃脲对斜纹夜蛾5龄幼虫酚氧化酶活性的影响

Fig. 3 Effects of hexaflumuron on phenoloxidase activity in 5th instar larvae of *Spodoptera litura*
CK: 加入 DMSO 溶剂对照 Mixed into DMSO as the control; 0: 空白对照 Blank control.

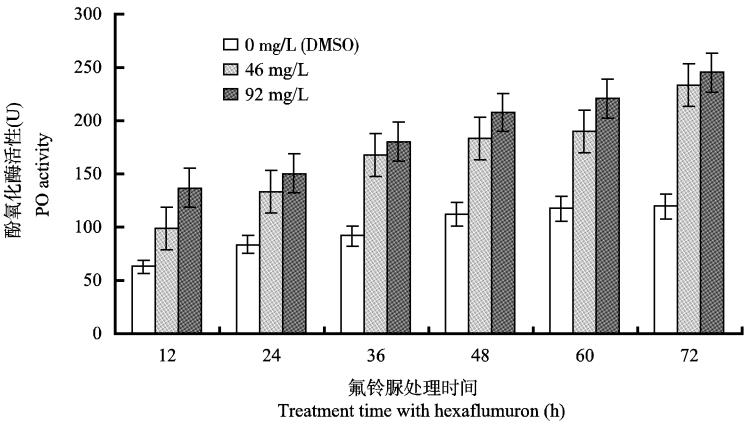


图4 氟铃脲处理不同时间后斜纹夜蛾5龄幼虫酚氧化酶活性的变化

Fig. 4 Chang in phenoloxidase activity in 5th instar larvae of *Spodoptera litura* after exposure to hexaflumuron for different time

2.5 氟铃脲对斜纹夜蛾幼虫不同组织酚氧化酶活性的影响

用两个亚致死剂量氟铃脲溶液浸泡饲料饲喂5龄幼虫24、48和72 h后，分别测定血淋巴、表皮和头部酚氧化酶的活性(表1)。结果表明：用46 mg/L和92 mg/L剂量处理后，5龄幼虫血淋巴酚氧化酶活性24 h分别提高105.8%和127.3%，48 h为128.8%和134.7%，72 h为134.6%和149.4%。幼虫表皮酚氧化酶活性24 h分别提高34.1%和41.0%，48 h为44.5%和80.2%，72 h为79.7%和115.2%。幼虫头部酚氧化酶活性24 h分别提高11.7%和31.9%，48 h为43.3%和70.6%，72 h为79.3%和88.7%。随着药剂处理时间的延长，氟铃脲对酚氧化酶的激活作用也呈逐渐增大趋势。药剂处理后相同时间，92 mg/L剂量对酚氧化酶的激活作用均高于46 mg/L剂量的激活

作用。通过比较同一剂量、处理相同时间的不同组织酚氧化酶活性结果，可以看出，氟铃脲对幼虫血淋巴酚氧化酶的激活作用最大，表皮次之，头部最低。上述结果表明，亚致死剂量氟铃脲能显著激活幼虫体内不同组织的酚氧化酶活性，对不同组织中酚氧化酶的激活作用不同。

2.6 氟铃脲对不同发育阶段预蛹和蛹酚氧化酶活性的影响

用两个亚致死剂量氟铃脲浸泡过的人工饲料连续饲喂5龄和6龄幼虫，直至幼虫停止取食并化蛹。分别测定预蛹前期、预蛹及不同天数蛹的酚氧化酶活性(表2)。结果表明，用46 mg/L和92 mg/L剂量处理后，预蛹前期老熟幼虫酚氧化酶活性分别提高44.0%和83.2%，预蛹提高80.7%和140.2%，化蛹后1、3 d和8 d分别提高35.5%和77.8%，32.7%和74.2%，61.8%和115.1%，46 mg/L处

表 1 氟铃脲处理不同时间斜纹夜蛾 5 龄幼虫血淋巴、表皮和头部酚氧化酶活性变化
Table 1 Chang in phenoloxidase activity in hemolymph, cuticle and heads of 5th instar larvae of *Spodoptera litura* after exposure to hexaflumuron for different time

虫体组织 Body tissue	药剂浓度 Concentration (mg/L)	氟铃脲处理幼虫时间 Exposure time of 5th instar larvae to hexaflumuron					
		24 h		48 h		72 h	
		酶活性(U)	酶活性提高率(%)	酶活性(U)	酶活性提高率(%)	酶活性(U)	酶活性提高率(%)
		PO activity	Activation rate of PO	PO activity	Activation rate of PO	PO activity	Activation rate of PO
血淋巴 Hemolymph	0	34.92 ± 2.79 a		40.07 ± 4.54 a		42.64 ± 3.32 a	
	46	71.87 ± 5.58 b	105.8	91.70 ± 4.35 b	128.8	100.05 ± 31.24 b	134.6
	92	79.39 ± 3.94 c	127.3	94.06 ± 2.21 b	134.7	106.36 ± 28.57 b	149.4
表皮 Cuticle	0	30.19 ± 4.12 a		34.23 ± 3.46 a		38.09 ± 4.03 a	
	46	40.49 ± 1.13 b	34.1	49.46 ± 5.67 b	44.5	68.44 ± 5.12 b	79.7
	92	42.57 ± 4.77 b	41.0	61.67 ± 5.21 c	80.2	81.91 ± 6.50 c	115.2
头部 Head	0	15.39 ± 2.17 a		24.45 ± 5.39 a		26.99 ± 3.42 a	
	46	17.19 ± 4.63 b	11.7	35.03 ± 2.59 b	43.3	48.40 ± 5.49 b	79.3
	92	20.30 ± 3.34 c	31.9	41.72 ± 1.74 c	70.6	50.93 ± 6.50 c	88.7

表中酶活性数据为平均值 ± 标准误, 同一虫体组织同一栏内数据后不同小写字母表示差异显著 (Tukey 氏检验, $P \leq 0.05$)。Data of phenoloxidase activity are means ± SE, and those in the same column of one body tissue followed by different small letters are significantly different by Tukey's test ($P \leq 0.05$).

表 2 氟铃脲处理斜纹夜蛾 5 龄和 6 龄幼虫后预蛹和蛹酚氧化酶活性
Table 2 Phenoloxidase activity in prepupae and pupae of *Spodoptera litura* after exposure of 5th and 6th instar larvae to hexaflumuron

发育历期 Developmental stage	溶剂对照 CK (DMSO)	氟铃脲浓度 Hexaflumuron concentrations			
		46 mg/L		92 mg/L	
		酶活性(U)	酶活性提高率(%)	酶活性(U)	酶活性提高率(%)
		PO activity	Activation rate of PO	PO activity	Activation rate of PO
预蛹前期 Early prepupa	30.92 ± 2.27 a	44.53 ± 3.66 b	44.0	56.64 ± 4.12 c	83.2
预蛹 Prepupa	55.39 ± 2.94 a	100.07 ± 8.03 b	80.7	133.06 ± 5.68 c	140.2
1 d 蛹 Pupa	5.81 ± 0.59 a	7.87 ± 1.18 b	35.5	10.33 ± 1.43 c	77.8
3 d 蛹 Pupa	4.62 ± 0.23 a	6.13 ± 0.37 b	32.7	8.05 ± 0.84 c	74.2
5 d 蛹 Pupa	1.78 ± 0.52 a	1.94 ± 0.49 a	—	2.27 ± 0.24 b	27.5
8 d 蛹 Pupa	8.80 ± 0.25 a	14.24 ± 0.93 b	61.8	18.93 ± 1.07 c	115.1

表中酶活性数据为平均值 ± 标准误, 同一行内数据后不同小写字母表示差异显著 (Tukey 氏检验, $P \leq 0.05$)。Data of phenoloxidase activity are means ± SE, and those in the same row followed by different small letters are significantly different by Tukey's test ($P \leq 0.05$).

理的 5 d 的蛹酶活性和对照相比无显著差异, 92 mg/L 处理的活性提高了 27.5%, 差异显著。两个亚致死剂量氟铃脲处理幼虫后均能提高预蛹和蛹酚氧化酶活性, 92 mg/L 剂量对酚氧化酶的激活作用

均高于 46 mg/L 剂量的激活作用。从实验数据还可以看出, 预蛹期酚氧化酶活性最高, 氟铃脲激活作用也最大; 化蛹后 8 d 次之, 5 d 最小。

3 讨论

本实验用 46 mg/L 和 92 mg/L 两个亚致死剂量氟铃脲处理 5 龄幼虫, 酚氧化酶活性随着处理时间的增长呈不断提高趋势, 高剂量的提高作用更大。血淋巴酚氧化酶活力最高, 氟铃脲对血淋巴中酚氧化酶活性的提高作用也最大。这与吴刚和尚稚珍 (1992) 用氟啶脲测定亚洲玉米螟幼虫的结果基本一致。氟铃脲连续处理幼虫后, 预蛹和蛹酚氧化酶活性均明显高于对照, 说明氟铃脲持续作用时间长, 具有一定的后效应。氟铃脲通过幼虫取食进入体内后, 与酚氧化酶作用的浓度会进一步降低。在幼虫体内氟铃脲浓度在还远没有达到 1 153 mg/L 的情况下, 就已经导致幼虫死亡。故在一般情况下, 氟铃脲对昆虫体内酚氧化酶活性基本上是呈激活状态。

低剂量氟铃脲可能对酚氧化酶酶原激活系统中的有关环节存在激活作用, 从而促进了酚氧化酶活性的提高。昆虫可以特异性地识别入侵的细菌、真菌等病原物, 并开启免疫防御系统吞噬入侵者。在此过程的初始阶段, 酚氧化酶酶原被活化成具有活性的酚氧化酶, 然后将酚类物质氧化, 并在其他酶的催化下, 经过一系列复杂的生化过程, 最终聚合成有毒的黑色素将病原物隔离或杀死 (Ashida and Brey, 1995; Yin *et al.*, 2001)。氟铃脲在低浓度时的这种刺激作用类似于病原微生物对酚氧化酶的激活作用。氟铃脲作为一种外来物质进入虫体, 也可能被虫体内的某种识别因子识别, 启动免疫系统, 使酚氧化酶含量增加, 表现为酚氧化酶活性升高。昆虫免疫防御机制是一个十分精密而复杂的系统, 少部分氟铃脲可能在昆虫体内经过代谢途径被排出体外, 而随着氟铃脲在昆虫体内积累越来越多, 不能被完全有效代谢或降解, 则表现为毒害作用。过多的酚氧化酶在昆虫体内可氧化酚类物质为醌, 醌对细胞有毒性。氟铃脲导致斜纹夜蛾幼虫死亡可能与其促进酚氧化酶活性提高有关。

经氟铃脲处理后, 幼虫最终都在开始蜕皮至蜕皮过程中死亡。死亡幼虫头部背面呈现突起的白色透明水泡状, 体壁变薄, 部分虫体黑化, 表现为蜕皮过程受到阻碍 (Unsal *et al.*, 2004)。昆虫体内酚氧化酶水平受到蜕皮激素等调控 (Hiruma *et al.*, 1985), 灭幼脲等可干扰昆虫体内保幼激素和蜕皮激素的平衡 (龚国玑等, 1989; 周保华等, 1991),

氟铃脲可能也具有类似作用。

氟铃脲等苯甲酰脲类杀虫剂的作用机理比较复杂, 还有许多问题尚待解决。研究氟铃脲对斜纹夜蛾酚氧化酶的影响, 有助于更系统地阐明此类杀虫剂的作用机理。随着对其作用机理的深入研究, 通过改变害虫体内酚氧化酶活性, 使害虫发育异常或丧失防御能力, 或生成过多的毒性物质来达到合理控制的目的。

参考文献 (References)

- Ashida M, Brey PT, 1995. Role of the integument in insect defense: Pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92: 10 698 – 10 702.
- Bayoumi AE, Balana-Fouce R, Sobeiha AK, Hussein EMK, 1997. The biochemical influences of some chitin synthesis inhibitors against the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Bol. San. Veg. Plagas*, 23: 583 – 593.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*, 72: 248 – 254.
- Brown GD, Gordon S, 2005. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cellular Microbiology*, 7(4): 471 – 479.
- Chen QJ, Li GH, Pang Y, 2000. A simple artificial diet for mass rearing of some noctuid species. *Chinese Bulletin of Entomology*, 37(6): 325 – 327. [陈其津, 李广宏, 庞义, 2000. 饲养五种夜蛾科昆虫的一种简易人工饲料. 昆虫知识, 37(6): 325 – 327]
- Gao XX, Luo WC, Xie GY, Xue CB, Ding Q, 2004. Characteristics and kinetics of inhibition of polyphenol oxidase from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientia Agricultura Sinica*, 37(5): 687 – 691. [高兴祥, 罗万春, 谢桂英, 薛超彬, 丁琦, 2004. 甜菜夜蛾多酚氧化酶的特性及其对曲酸等抑制剂的反应. 中国农业科学, 37(5): 687 – 691]
- Gong CJ, Zhou BH, Zhang KL, You ZP, 1989. Study on the toxicology of diflubenzuron IV. The hormonal mimic effects of diflubenzuron. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 12(4): 67 – 71. [龚国玑, 周保华, 张开龙, 尤子平, 1989. 灭幼脲毒理学研究 IV. 灭幼脲的激素效应模拟试验. 南京农业大学学报, 12(4): 67 – 71]
- Hiruma K, Riddiford LM, 2009. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 245 – 253.
- Hiruma K, Riddiford LM, Hopkins TL, Morgan TD, 1985. Roles of dopa decarboxylase and phenoloxidase in the melanization of the tobacco hornworm and their control by 20-hydroxyecdysone. *Journal of Comparative Physiology B*, 155: 659 – 669.
- Ishaaya I, Casida JE, 1974. Dietary TH6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 4: 484 – 490.
- Ishaaya I, Yablonski S, 1976. Induction of prolonged larval feeding stage

- by juvenile hormone analogues in *Tribolium castaneum*. *Phytoparasitica*, 4(1): 9–18.
- Post LC, De Jong BJ, Vincent WR, 1974. 1-(2, 6-Disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: Inhibitors of chitin synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 4: 473–483.
- Schneider M, Smagghe G, Pineda S, Vinuela E, 2008. The ecological impact of four IGR insecticides in adults of *Hyposoter didymator* (Hym., Ichneumonidae): Pharmacokinetics approach. *Ecotoxicology*, 17: 181–188.
- Soltani N, Besson MT, Delachambre J, 1984. Effect of diflubenzuron on the pupal-adult development of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae): Growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density, and DNA synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21: 256–264.
- Sugumaran M, Nellaippan K, 2000. Characterization of a new phenoloxidase inhibitor from the cuticle of *Manduca sexta*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268: 379–383.
- Unsal S, Ozparlak H, Aktumsek A, 2004. Effects of diflubenzuron on the integument of fifth instar *Galleria mellonella* larvae. *Phytoparasitica*, 32(1): 43–51.
- Wappner P, Kramer KJ, Hopkins TL, Merritt M, Schaefer J, Quesada-Allue LA, 1995. White pupa: a *Ceratitis capitata* mutant lacking catecholamines for tanning the puparium. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(3): 365–373.
- Wu G, Shang ZZ, 1992. Effects of atabron on phenoloxidase and chitinase in the cuticle of *Ostrinia furnacalis* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 35(3): 306–311. [吴刚, 尚稚珍, 1992. 抑太保对亚洲玉米螟表皮酚氧化酶及几丁质酶活力的影响. 昆虫学报, 35(3): 306–311]
- Xiao T, Xue CB, Xie XY, Luo WC, 2007. Inhibitory effects of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline on phenoloxidase from *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(9): 900–906. [肖婷, 薛超彬, 解先业, 罗万春, 2007. 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶的抑制作用. 昆虫学报, 50(9): 900–906]
- Yin LH, Wang CZ, Qin JD, 2001. Effect of endoparasitoid *Campoletis chloridae* on phenoloxidase activity in *Helicoverpa armigera* hemolymph. *Chinese Science Bulletin*, 46(21): 1 797–1 800.
- Yu SJ, Terriere LC, 1975. Activities of hormone metabolizing enzymes in house flies treated with some substituted urea growth regulators. *Life Science*, 17: 619–626.
- Zhou BH, Gong GJ, You ZP, 1991. Study on the toxicology of diflubenzuron V. The effect of diflubenzuron on hormonal equilibrium of *Mythimana separata* (Walker) in larval-pupal development. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 14(4): 33–38. [周保华, 龚国玘, 尤子平, 1991. 灭幼脲毒理学研究 V. 灭幼脲对东方粘虫蜕皮激素的影响. 南京农业大学学报, 14(4): 33–38]
- Zhou ZS, Deng GR, Luo SP, 2003. Study and application of the insect growth regulators. *Guangxi Agricultural Science*, (1): 34–36. [周忠实, 邓国荣, 罗淑萍, 2003. 昆虫生长调节剂研究与应用概况. 广西农业科学, (1): 34–36]

(责任编辑: 赵利辉)