

徐志红,李俊凯.多杀菌素对亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶和酯酶同工酶的影响[J].江苏农业科学,2015,43(10):149-151.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.045

多杀菌素对亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶和酯酶同工酶的影响

徐志红,李俊凯

(长江大学湿地生态与农业利用教育部工程研究中心,湖北荆州 434201)

摘要:研究多杀菌素对亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶、酯酶同工酶的影响。结果表明,离体时多杀菌素不影响亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶活性,但在活体时处理 48 h 后显著抑制碱性磷酸酯酶的活性;离体时多杀菌素对亚洲玉米螟酯酶同工酶活性并无影响,但是在活体时酯酶同工酶 E4、E5、E6 酶带受到明显抑制。

关键词:多杀菌素;亚洲玉米螟;碱性磷酸酯酶;酯酶同工酶

中图分类号:S435.132 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0149-02

酯酶是昆虫对杀虫剂进行代谢的最重要酶系之一,不同酯酶活性的升高或联合作用的增强是多种昆虫对拟除虫菊酯和有机磷类杀虫剂产生抗药性的重要原因^[1-2]。在已进行抗性研究的昆虫中,其抗性机理几乎涉及酯酶的代谢作用^[3],磷酸酯酶在水解有机磷农药和拟除虫菊酯中起着重要作用^[4]。研究开发作用机理新颖的杀虫剂是害虫抗性治理的最有效方法。多杀菌素(Spinosad)是一种作用机理独特的杀虫剂,是 Spinosyn A 和 Spinosyn D 的混合物(前者占 80%,后者占 20%),已经确认它作用于害虫的神经系统。Salgado 认为,多杀菌素作用于烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)^[5];Watson 的研究表明多杀菌素也作用于 γ -氨基丁酸受体(GABA)^[6];王光峰等研究了多杀菌素对甜菜夜蛾羧酸酯酶的影响,发现多杀菌素在离体时对羧酸酯酶无抑制作用,但在活体时能诱导虫体内羧酸酯酶活性增强^[7]。笔者所在课题组研究发现,Spinosyn A 对辛硫磷有弱的增效作用^[8],这种增效作用可能是与有机磷代谢相关酶的活性被多杀菌素抑制所致,因此多杀菌素对碱性磷酸酯酶和酯酶同工酶影响的研究显得尤为必要。本研究以同样作用于 GABA 的阿维菌素为对照药剂,探讨 Spinosyn A 对亚洲玉米螟 5 龄幼虫碱性磷酸酯酶、酯酶同工酶的影响,以期有助于阐明该药剂的毒理机制。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)按周大荣等的方法^[9]室内人工累代饲养,温度(26±2)℃,光照度 2 000 lx。

1.2 试验试剂

Spinosyn A:浓度为 96.3%,由美国陶氏益农公司提供原粉;对硝基苯基磷酸二钠:生工生物工程(上海)股份有限公司;对硝基酚:天津化学试剂一厂;其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期:2015-03-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:31371976)。

作者简介:徐志红(1978—),男,湖北汉川人,博士,讲师,主要从事农药学研究。E-mail:x_u_78@sina.com。

1.3 对硝基酚标准曲线的制作

称取 0.013 9 g 对硝基酚,用 1 mL 丙酮溶解,加水定容至 100 mL,浓度为 1 mmol/L,用时再用蒸馏水稀释 1 倍,即成 0.5 mmol/L 对硝基酚标准溶液。分别取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 0.5 mmol/L 对硝基酚标准溶液,加入 2 mL 0.1 mol/L NaOH,混匀后在 400 nm 波长处测吸光度,重复 3 次,取平均值,以对硝基酚(μ mol)为横坐标, $D_{400\text{ nm}}$ 值为纵坐标,绘制对硝基酚标准曲线并计算回归方程。

1.4 试虫处理和酶源制备

取 5 头亚洲玉米螟 5 龄初幼虫,用蒸馏水将体表冲洗干净,滤纸吸干,置于 5 mL 0.05 mol/L 碳酸钠缓冲液(pH 值 9.9)中匀浆 30 s,于 4℃、3 000 r/min 离心 15 min,取上清液作酶源。活体试验同样取 5 龄初孵幼虫,点滴处理其前胸背板,每头点滴 1 μ L 以丙酮为溶剂的不同浓度的 Spinosyn A 药液,对照组(CK)仅用丙酮,常规条件下饲养,24、48 h 后取出制备酶源。

1.5 碱性磷酸酯酶活性测定方法

碱性磷酸酯酶活性测定参照邱明生等的方法^[10],略加改进。碱性磷酸酯酶活力测定的反应混合液为 2.3 mL 0.05 mol/L、pH 值 9.9 碳酸钠缓冲液,0.5 mL 7.5 mmol/L 对硝基苯基磷酸二钠和 0.2 mL 酶液(蛋白量约 100 μ g)。以 1 mg 蛋白 1 min 生成的对硝基酚量表示酶的比活力,单位为 nmol/(mg·min)。

1.6 Spinosyn A 对亚洲玉米螟酯酶同工酶的影响

1.6.1 酶源制备 制备酶源时取 10 头亚洲玉米螟 5 龄幼虫,于 3 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)中冰浴整体匀浆,然后在 4℃、3 000 r/min 离心 10 min,纱布过滤上清液,于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液作酶源备用。离体酶活性试验药剂处理同上,处理后按酶源:40%蔗糖:0.03%溴酚蓝=2:1:1 混匀,迅速点样进行电泳。

1.6.2 酯酶同工酶电泳 凝胶制备和电泳检测参照慕立义的方法^[11],并略有修改。分离胶浓度采用 10%,缩胶浓度为 2.5%,用垂直板状电泳于冰箱中电泳,电压 150 V,起始电流 10 mA,待指示剂前缘进入浓缩胶,电流加大并恒定于 20 mA,样品蛋白量 30 μ g,电泳结束后以乙酸- α -萘酯为底物、以

坚牢兰 B 为显色剂,37 ℃ 水浴染色 15 min,然后用 7% 冰乙酸脱色、固定。

2 结果与分析

2.1 Spinosyn A 对亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶离体和活体活性的影响

不同浓度的 Spinosyn A 对亚洲玉米螟 5 龄幼虫碱性磷酸酯酶离体和活体活性影响如表 1、表 2 所示。

由表 1 可知,从 Spinosyn A 对亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶的抑制率上看,各处理组与对照组相比都有微弱的激活,但各处理组之间无太大差异,这表明 Spinosyn A 对亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶离体活性虽有影响,但 Spinosyn A 并不直接作用于亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶。

由表 2 可以看出,经 Spinosyn A 处理 24 h 之后,处理组与对照组的碱性磷酸酯酶比活力都有了明显变化,低浓度时(0.1 μmol/L)碱性磷酸酯酶被诱导活化,而在高浓度时(1 μmol/L)相对于对照组其碱性磷酸酯酶被明显抑制。对

表 1 不同浓度 Spinosyn A 对亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶离体活性的影响

| 处理浓度 (mmol/L) | 比活力 [nmol/(mg·min)] | 抑制率 (%) |
|-------------------|------------------------|------------|
| 0.01 (Spinosyn A) | 23.86 ± 0.18bc | -1.13 |
| 0.1 (Spinosyn A) | 24.10 ± 0.06ab | -2.07 |
| 1 (Spinosyn A) | 24.37 ± 0.10a | -3.20 |
| 0.1 (阿维菌素) | 24.01 ± 0.05ab | -1.69 |
| CK | 23.61 ± 0.13c | |

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

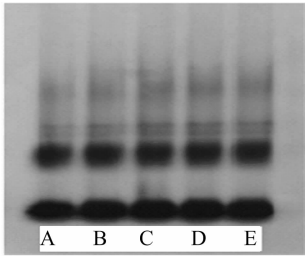
照药剂阿维菌素同样也表现出在低浓度时其碱性磷酸酯酶被激活,高浓度时被抑制的特性。经 Spinosyn A、阿维菌素处理 48 h 之后,处理组的碱性磷酸酯酶比活力有了新的变化,所有处理组都表现出抑制作用,高浓度药剂比低浓度的抑制率要高些,方差分析的结果表明,所有处理组的比活力与对照组间差异显著。

表 2 Spinosyn A 对亚洲玉米螟碱性磷酸酯酶活体活性的影响(处理 24、48 h)

| 处理浓度 (μmol/L) | 处理 24 h 比活力 [nmol/(mg·min)] | 处理 24 h 抑制率 (%) | 处理 48 h 比活力 [nmol/(mg·min)] | 处理 48 h 抑制率 (%) |
|------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|
| 0.1 (Spinosyn A) | 37.60 ± 0.18a | -28.43 | 35.00 ± 0.03b | 18.22 |
| 1 (Spinosyn A) | 25.37 ± 0.17d | 13.36 | 32.23 ± 0.06d | 24.69 |
| 0.1 (阿维菌素) | 32.77 ± 0.15b | -11.92 | 34.52 ± 0.19b | 19.32 |
| 1 (阿维菌素) | 25.32 ± 0.20d | 13.55 | 33.73 ± 0.10c | 21.18 |
| CK | 29.28 ± 0.08c | | 42.80 ± 0.31a | |

2.2 Spinosyn A 对亚洲玉米螟酯酶同工酶的影响

图 1、图 2 分别为 Spinosyn A 对亚洲玉米螟离体、活体酯酶同工酶的电泳图。由图 1 可知,在离体条件时 Spinosyn A、阿维菌素与对照组相比,其电泳酶带都没有明显差别,说明在离体时酯酶同工酶的活性并不受到抑制。



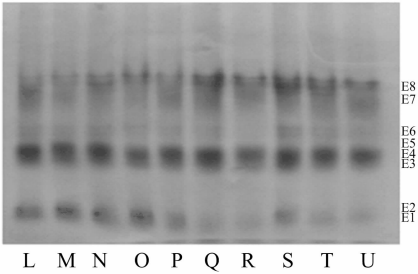
A、B、C、D、E 分别为离体时的 CK、0.01 mmol/L Spinosyn A、0.1 mmol/L Spinosyn A、0.01 mmol/L 阿维菌素、0.1 mmol/L 阿维菌素处理组

图 1 离体酯酶同工酶电泳结果

由图 2 可知,处理 24 h 后,0.1 μmol/L 的 Spinosyn A 处理组与对照组比,E6 受到弱的抑制作用,其余酶带无明显差异;而 0.1、1 μmol/L 阿维菌素的 E6 酶带与对照组相比皆有明显抑制。在处理 48 h 的酶带图中,浓度为 0.1 μmol/L 的 Spinosyn A 组的 E4、E5 酶带都明显变弱,E6 酶带也有减弱,1 μmol/L 的 Spinosyn A 处理组与对照组无明显差异;而 0.1、1 μmol/L 阿维菌素处理组的 E4、E5 酶带都有强的减弱,1 μmol/L 处理组的 E6 酶带完全消失,表明受到了强的抑制作用。

3 结论与讨论

磷酸酯酶广泛存在不同种类昆虫中,是昆虫体内的一种



L、M、N、O、P 分别为处理 24 h 的 CK、0.1 μmol/L Spinosyn A、1 μmol/L Spinosyn A、0.1 μmol/L 阿维菌素、1 μmol/L 阿维菌素; Q、R、S、T、U 分别为处理 48 h 的 CK、0.1 μmol/L Spinosyn A、1 μmol/L Spinosyn A、0.1 μmol/L 阿维菌素、1 μmol/L 阿维菌素; E1~E6—不同的同工酶

图 2 活体 24、48 h 酯酶同工酶电泳结果

主要的代谢解毒酶,它们参与中间代谢,对昆虫的生长发育起着重要作用。磷酸酯酶包括磷酸三酯水解酶和磷酸二酯水解酶,前者包括芳基酯水解酶和 O-烷酯水解酶,分别可使有机磷脱去芳基和 O-烷基,而后者主要是使脱烷基的磷酸酯产生水解^[12]。本研究的结果表明,在离体条件时,Spinosyn A 对亚洲玉米螟幼虫体内的碱性磷酸酯酶并无抑制作用;但是在活体条件时,处理 24 h 后就出现在低浓度(0.1 μmol/L)时激活碱性磷酸酯酶的活性,而在高浓度时(1 μmol/L)抑制其活性,在处理 48 h 后则 2 种浓度下都表现出明显的抑制作用,这说明虽然 Spinosyn A 对亚洲玉米螟幼虫体内的碱性磷酸酯酶没有直接作用,但是它能通过间接的途径影响碱性磷酸酯酶的活性,最终表现出对碱性磷酸酯酶的抑制作用,这大概也是其在昆虫体内降解缓慢的原因之一。同时,在活体条件下 Spinosyn A 对亚洲玉米螟幼虫体内的碱性磷酸酯酶的抑制与

李建文,高易宏,吴 辉,等. 生防菌 BS04 防治辣椒疫病机制[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):151-153.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.046

生防菌 BS04 防治辣椒疫病机制

李建文,高易宏,吴 辉,江 翱,孙文秀

(长江大学生命科学学院,湖北荆州 434025)

摘要:从生防菌的根际定殖、防效和诱导防御酶活性 3 个方面探讨了生防菌 BS04 防治辣椒疫病的机制。结果表明,生防菌 BS04 能够在辣椒根际定殖,且定殖密度比较稳定,稳定维持在 10^5 CFU/g 以上;盆栽试验测定防治效果表明,生防菌 BS04 的培养液对辣椒幼苗期疫病有较明显的防治效果,防效达 85.81%;防御酶活性测定结果显示,接种辣椒疫霉菌后,辣椒叶片的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和多酚氧化酶(PPO)的活性均显著提高并出现峰值,但生防菌 BS04 培养液和辣椒疫霉菌共同处理后,各种防御酶的活性有所降低,并表现出相对平缓的状态。

关键词:生防菌;辣椒疫病;防病机制;生物防治;防御酶

中图分类号:S436.418.1⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0151-03

辣椒疫病由辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)引起,是辣椒生长过程中发生比较严重的土传病害^[1-3]。多年来,国内外学者使用化学药剂^[4]、选育抗病品种^[5]、生物防治^[6]等措施不断加强对辣椒疫病的防治。但由于辣椒疫霉菌变异能力强,致病力分化明显,容易产生抗药性,采用化学药剂和选育抗病品种防治辣椒疫病存在极大的弊端。利用有益微生物防治

辣椒疫病成为首选的有效措施,越来越多的生防菌也受到了人们的关注。目前,已从土壤及植物等不同来源分离筛选到若干株对辣椒疫霉菌具有拮抗作用的生防菌^[7-14],但对其防病机制的研究还不够深入。笔者从辣椒根际土壤中分离筛选到对辣椒疫霉菌具有较强的抑制作用,且对其他几种病原菌具有拮抗作用的生防菌 BS04(待发表)。为进一步明确生防菌 BS04 对辣椒疫病的防治效果,本试验对该菌株在辣椒根际的定殖、对辣椒疫病的防效及对辣椒叶片防御酶的活性影响进行了研究,为更深入探讨其防病机制提供资料和奠定基础。

收稿日期:2014-10-09

基金项目:长江大学生命科学学院创新训练计划(编号:2013024);烟草病虫害监测与治理重点开放实验室开放课题(编号:201204)。

作者简介:李建文(1990—),男,甘肃白银人,从事生物技术研究。

E-mail:lijianwen@163.com。

通信作者:孙文秀,博士,副教授,主要从事植物病害的生物防治。

E-mail:wxsun@yangtzeu.edu.cn。

笔者所在课题组前期研究结果^[8]是一致的,可能是多杀菌素对辛硫磷增效的原因之一。至于 Spinosyn A 在活体条件下是通过何种方式抑制碱性磷酸酯酶的活性有待于进一步研究。

亚洲玉米螟的酯酶同工酶电泳酶带结果表明,在离体时 Spinosyn A 并不影响酯酶同工酶;在活体时,E6 受到一定程度的抑制。阿维菌素也同样对 E6 酶带有抑制作用,表明这 2 种大环内酯化合物都能抑该酶的活性。至于这个酶带具体是什么酶、有什么特点有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Lee S H, Clark J M. Permethrin carboxylesterase functions as nonspecific sequestration proteins in the Hemolymph of Colorado potato beetle [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1998, 62(1): 51-63.
- [2] Zhu K Y, Gao J R. Kinetic properties and variability of esterases in organophosphate-susceptible and -resistant greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1998, 62(2): 135-145.
- [3] 唐振华. 我国昆虫抗药性研究的现状及展望 [J]. 昆虫知识, 2000, 37(2): 97-103.

1 材料与方法

1.1 供试菌株和培养基

供试菌株 BS04 为笔者所在实验室从辣椒根际土壤中分

- [4] 赵善欢. 昆虫毒理学 [M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [5] Salgado V L. The mode of action of spinosad and other insect control products [J]. Down to Earth, 1997(52): 35-44.
- [6] Watson G B. Actions of insecticidal spinosyns on aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2001, 71(1): 20-26.
- [7] 王光峰, 张友军, 柏连阳, 等. 多杀菌素对甜菜夜蛾多酚氧化酶和羧酸酯酶的影响 [J]. 农药学报, 2003, 5(2): 40-46.
- [8] 徐志红, 蒋志胜. Spinosyn A 对家蝇 GSTs 的影响及其对辛硫磷的增效作用 [J]. 贵州农业科学, 2007(6): 62-63, 65.
- [9] 周大荣, 王玉英, 刘宝兰, 等. 玉米螟人工大量繁殖研究: I. 一种半人工饲料及其改进 [J]. 植物保护学报, 1980, 7(2): 113-122.
- [10] 邱明生, 王进军, 赵志模, 等. 辐射对亚洲玉米螟体内几种水解酶活力的影响 [J]. 植物保护学报, 1999, 26(4): 319-323.
- [11] 慕立义. 植物化学保护研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 162-163.
- [12] Matsumura F, Ghiasuddin S M. Characteristics of DDT-sensitive Ca-ATPase in the axonic membrane [M] // Narahashi T. Neurotoxicology of Insecticides and Pheromones. New York: Plenum Press, 1979: 245-257.