

· 研究论文 ·

三种内吸性杀虫剂对棉花多酚氧化酶 和羧酸酯酶活性的影响

王业霞, 史雪岩*, 梁沛, 高希武

(中国农业大学 昆虫学系, 北京 100094)

摘要:用含不同浓度氧化乐果、吡虫啉和 硫克百威的营养液分别处理棉花幼苗, 研究不同处理时间其多酚氧化酶和羧酸酯酶活性的变化。结果表明, 3种内吸性杀虫剂对两种酶活性的影响不仅与药剂种类有关, 还具有一定的剂量效应和时间效应。400 mg/L 氧化乐果处理后 24 h, 棉花幼苗中多酚氧化酶活性比对照降低 21.6%; 50 mg/L 吡虫啉处理后 120 h 多酚氧化酶活性比对照增高 47.3%; 200 mg/L 硫克百威处理后 72 h 多酚氧化酶活性增高 75.7%。氧化乐果处理后 120 h 内, 各处理羧酸酯酶的活性均低于对照, 且抑制率在 70% 以上; 50 mg/L 吡虫啉处理后 120 h, 羧酸酯酶活性比对照增高 30.7%; 硫克百威处理后 120 h 内, 羧酸酯酶活性与对照比较均无显著差异。

关键词:氧化乐果; 吡虫啉; 硫克百威; 棉花; 多酚氧化酶; 羧酸酯酶

中图分类号: S482.3 S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)04-0319-04

Effects of Insecticides on the Activities of Polyphenol Oxidase and Carboxylesterase in Cotton Seedlings

WANG Ye-xia SHI Xue-yan*, LIANG Pei GAO Xi-wu

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The effects of omethoate, imidacloprid and carbosulfan on the activities of polyphenol oxidase (PPO) and carboxylesterase (CaE) in cotton seedlings were investigated after treated for different period of time. The results showed that the effects on PPO and CaE activities in cotton seedlings related not only to the insecticides used, but also to the concentration of the insecticides and the treated time. The activities of PPO in cotton seedlings decreased by 21.6% after treated with 400 mg/L omethoate for 24 h. After treated with 50 mg/L imidacloprid for 120 h, the PPO activities increased by 47.3%. Using 200 mg/L carbosulfan treated the cotton seedlings for 72 h, the activities of PPO increased by 75.7%. The activities of CaE in cotton seedlings decreased by more than 70% after treated with 100, 200 and 400 mg/L omethoate during the period of 120 h. Using 50 mg/L imidacloprid treated cotton seedlings for 120 h, the CaE activities increased by 30.7%. But the CaE activities of control and the seedlings treated with 50, 100 and 200 mg/L carbosulfan showed

收稿日期: 2006-08-10 修回日期: 2006-11-02

作者简介: 王业霞 (1982-), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 史雪岩 (1968-), 女, 副教授, 研究方向为农药毒理学, 联系电话: 010-62731306
E-mail: shixueyan@sohu.com

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划 (NCET)”资助; 国家重点基础研究发展规划 (973计划) (2006CB102003); “十一五”国家支撑计划课题 (2006BAD08A03)。

no significant difference at all the treated time

Key words omethoate; imidacloprid; carbosulfan; cotton; polyphenol oxidase (PPO); carboxylesterase (CarE)

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 和羧酸酯酶 (carboxylesterase, CarE) 是植物生长发育过程中不可缺少的重要酶系。多酚氧化酶催化植物组织中的邻二羟基酚生成邻位醌, 从而改变蛋白或氨基酸的溶解度及其对昆虫的营养价值, 还可防御植物病原菌的侵染^[1]。病原菌侵染、害虫取食、机械损伤、化学物质等多种因素均可诱导植物体内多酚氧化酶等防御相关酶的活性发生改变^[2-5]。羧酸酯酶是普遍存在于真核和原核生物中的水解酶系, 植物中的羧酸酯酶可以代谢除草剂及环境中的有毒物质^[6]。Haslam 认为有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的施用有可能通过影响植物中羧酸酯酶的活性而改变除草剂在植物体内的代谢^[7]。但目前有关化学物质对植物羧酸酯酶活性影响的研究还较少见报道。

化学防治是农业生产中控制植物病虫害的主要手段之一, 但同时也会对作物产生一定的影响。研究表明, 杀菌剂、除草剂和杀虫剂的施用会对作物本身的生理生化机制产生影响。如杀菌剂咯菌清包衣处理使西瓜幼苗中丙二醛的积累量下降, 使可溶性蛋白含量、抗病性相关酶活性增高^[2]; 除草剂草甘膦可使莎草中多酚氧化酶活性显著增高^[8]; 杀虫剂灭多威和甲基对硫磷等可使植物光合速率、叶肉传导率和气孔传导率显著下降^[9-11]。但有关杀虫剂对棉花中各种防御相关酶系影响的研究目前尚未见报道。内吸性杀虫剂氧化乐果、吡虫啉和丁硫克百威对棉蚜 *Aphis gossypii* Glover、棉叶螨 *Tetranychus telarius* (Bois)、棉叶蝉 *Empoasca biguttula* (Shiraki) 和绿盲蝽 *Lygus hicolorum* Meyer-D 等害虫都有较好的防治效果, 在棉花生产中应用广泛。笔者研究考察了这 3 种药剂对棉花幼苗中多酚氧化酶和羧酸酯酶活性的影响, 以期研究杀虫剂对棉花抗虫抗病性和对外来物质代谢的影响提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

棉花品种为冀棉 19

76.59% 的氧化乐果 (omethoate) 原药 (河北新兴化工有限责任公司); 95% 吡虫啉 (imidacloprid) 原药 (石家庄化工厂); 88.44% 的丁硫克百威

(carbosulfan) 原药 (苏州富美实植物保护剂有限公司); 聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP, 北京欣经生物技术有限公司); 乙酸- α -萘酯 (α -NA, 分析纯, 上海化学试剂公司); 固蓝 B 盐和考马斯亮蓝 G-250 (Fluka 公司进口, 上海化学试剂公司分装); 十二烷基硫酸钠 (SDS) 及邻苯二酚 (北京化学试剂公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 棉花幼苗处理 棉种催芽后, 用湿砂盘法播种于无菌沙土中 (26~30℃, 相对湿度 50%~60%)。待两片子叶展开后转移至装有营养液的塑料杯中, 在日光温室内培养 6~7 d 供试。

采用分别含 100、200 和 400 mg/L 氧化乐果, 12.5、25.0 和 50.0 mg/L 吡虫啉, 50、100 和 200 mg/L 丁硫克百威 (即分别与推荐浓度相当、高于和低于其 1 倍的浓度) 的营养液分别处理棉花幼苗, 待药剂内吸到幼苗体内后于 24、48、72、96、120 h 分别取样测定。药剂先用丙酮配制成母液, 试验时再分别用棉花营养液稀释成不同浓度。以丙酮作对照, 设 3 次重复。

1.2.2 酶液提取 取棉花子叶 2 g 在液氮中研磨, 加 0.2 g PVPP 和 5 mL 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液, 10 000×g (4℃) 离心 30 min 取上清液作为酶液。

1.2.3 酶活性测定

1.2.3.1 多酚氧化酶 (PPO) 比活力测定 参照梁沛等^[12]的方法并稍有改变。将 0.6 mL 0.05 mol/L pH 5.9 的磷酸缓冲液、0.4 mL 0.1 mol/L 的邻苯二酚、0.15 mL 酶液依次加入比色皿中, 放入 UV Lambda Bio 40 型双光束扫描分光光度计中, 在 420 nm 下用时间驱动程序测其在 2 min 内的 OD 值变化。实验设 3 次重复, 每次重复平行测定 3 次。

1.2.3.2 羧酸酯酶 (CarE) 比活力测定 参照 van Asperen^[13]和 Haslam 等^[7]的方法并稍有改变。反应体系含 0.5 mL 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液, 1.3 mL 6×10^{-4} mol/L 的 α -NA 及 0.2 mL 稀释后的酶液。30℃ 水浴 30 min 后, 加入 1 mL 显色剂 (质量分数为 1% 的固蓝 B 盐和 5% 的 SDS 按体积比 2:5 混合) 终止反应。对照在反应终止后加入酶液。静置 15 min 后, 测其 OD₆₆₀ 值。实验设 3 次重复, 每次重复平行测定 3 次。

1.2.4 蛋白质含量测定 参照 Bradford^[14]的考马斯亮蓝 G-250法。

1.2.5 数据统计方法 计算所得酶活性值用 In stat 3数据处理软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 药剂对棉花多酚氧化酶活性的影响

处理后 120 h内不同时间分别取样测定多酚氧化酶的活性, 结果见表 1。

100 mg/L 氧化乐果处理后 120 h内, 酶活性与

对照无显著差异; 200和 400 mg/L 处理后 24 h 酶活性分别比对照降低了 17.5% 和 21.6%, 差异显著。而随处理时间延长, 氧化乐果对多酚氧化酶活性的抑制作用减弱, 与对照差异不显著。

12.5 mg/L 吡虫啉处理后 120 h内酶活性无显著变化; 25和 50 mg/L 对酶活性的影响在 72 h内不显著, 但随处理时间延长至 96 h, 酶活性分别比对照显著增高 43.7% 和 44.0%; 50 mg/L 处理后 120 h 酶活性比对照显著增高 47.3%。

Table 1 Effects of insecticides on the activities of polyphenol oxidase (PPO) in cotton seedlings

Insecticide	Concentration /(mg/L)	The activities of PPO in cotton seedlings/(OD·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ pro)				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Omethoate	CK	0.274±0.014 a	0.198±0.033 ab	0.165±0.036 a	0.120±0.008 a	0.124±0.019 a
	100	0.310±0.019 a	0.255±0.042 a	0.180±0.047 a	0.122±0.010 a	0.164±0.050 a
	200	0.226±0.024 b	0.172±0.013 ab	0.151±0.026 a	0.143±0.024 a	0.149±0.034 a
	400	0.202±0.012 c	0.155±0.032 b	0.134±0.025 a	0.155±0.024 a	0.133±0.054 a
Imidacloprid	CK	0.223±0.008 a	0.281±0.073 a	0.351±0.008 a	0.252±0.051 b	0.349±0.078 b
	12.5	0.217±0.065 a	0.291±0.029 a	0.366±0.021 a	0.269±0.049 ab	0.492±0.041 b
	25.0	0.171±0.067 a	0.350±0.089 a	0.396±0.079 a	0.360±0.031 a	0.479±0.039 b
	50.0	0.215±0.059 a	0.373±0.068 a	0.346±0.048 a	0.363±0.011 a	0.514±0.079 a
Carbosulfan	CK	0.345±0.067 a	0.302±0.059 a	0.318±0.070 b	0.502±0.042 ab	0.270±0.058 a
	50	0.240±0.084 a	0.312±0.092 a	0.357±0.035 ab	0.493±0.059 b	0.324±0.100 a
	100	0.271±0.097 a	0.411±0.083 a	0.519±0.095 a	0.685±0.020 a	0.259±0.033 a
	200	0.312±0.037 a	0.434±0.069 a	0.559±0.061 a	0.709±0.119 a	0.272±0.097 a

Note: The data showed in the table are mean±SE, different small letters mean significant difference ($P < 0.05$). The same as in table 2.

50 mg/L 丁硫克百威处理后 120 h内酶活性无显著变化; 100和 200 mg/L 处理后 72 h 酶活性分别比对照显著增高 63.2% 和 75.7%, 而随处理时间延长, 影响趋于不显著。其中, 处理后 96 h 100和 200 mg/L 处理组酶活性比 50 mg/L 组显著增高。

2.2 药剂对棉花羧酸酯酶活性的影响

处理后 120 h内不同时间分别取样测定羧酸酯酶的活性, 结果见表 2。

100、200和 400 mg/L 氧化乐果处理后 24 h 酶活性分别比对照降低 74.1%、86.4% 和 90.6%; 48至 120 h, 各浓度处理组酶活性均有 90% 以上被抑制, 且不同浓度处理组之间差异均不显著。

12.5、25.0和 50.0 mg/L 吡虫啉处理后 24 h, 酶活性分别比对照增高 15.1%、14.8% 和 13.5%, 且差异显著; 而处理后 48和 72 h 各处理组与对照均无显著差异。50 mg/L 吡虫啉处理后 96及 120 h 酶活性分别比对照增高 21.6% 和 30.7%, 差异显著。

50、100和 200 mg/L 丁硫克百威处理后 120 h内, 羧酸酯酶活性与对照比较均无显著变化; 但处理后 96 h, 200 mg/L 处理组酶活性显著高于 50 mg/L 处理组。

3 结论与讨论

本研究结果表明, 氧化乐果、吡虫啉和丁硫克百威对棉花幼苗中多酚氧化酶和羧酸酯酶活性的影响不仅与杀虫剂的种类有关, 而且具有一定的剂量效应和时间效应。

低于推荐使用浓度的 3种杀虫剂在处理后 120 h内均未引起棉花多酚氧化酶活性的显著改变, 而与推荐使用浓度相当或比其高 1 倍的剂量则使酶活性显著增高或降低。其中 200和 400 mg/L 氧化乐果处理后 24 h, 多酚氧化酶活性表现为降低。但随着处理时间的延长, 药剂对酶活性的抑制作用减轻, 可能是由于棉花通过某种生理生化机制对氧化乐果产生了一定的解毒作

用,从而减轻了其对酶活性的抑制。与氧化乐果的抑制作用不同,吡虫啉和丁硫克百威可诱导棉花多酚氧化酶活性增高,但这种影响的出现相对较慢,25.0和50.0 mg/L吡虫啉处理后96 h

100和200 mg/L丁硫克百威处理后72 h棉花多酚氧化酶活性才显著增高。这可能与随处理时间延长,杀虫剂在幼苗体内积累的量增多有关。

Table 2 Effects of insecticides on the activities of carboxy esterase (CaE) in cotton seedlings

Insecticide	Concentration (mg/L)	The activities of CaE in cotton seedlings/(OD · min ⁻¹ · mg ⁻¹ pro)				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Omethoate	CK	0.923 ± 0.098 a	0.703 ± 0.037 a	0.772 ± 0.053 a	0.647 ± 0.044 a	0.640 ± 0.065 a
	100	0.201 ± 0.052 b	0.066 ± 0.007 b	0.069 ± 0.007 b	0.042 ± 0.005 b	0.052 ± 0.012 b
	200	0.125 ± 0.009 b	0.053 ± 0.014 b	0.059 ± 0.005 b	0.040 ± 0.006 b	0.044 ± 0.004 b
	400	0.086 ± 0.005 b	0.057 ± 0.007 b	0.048 ± 0.005 b	0.037 ± 0.012 b	0.046 ± 0.007 b
Imidacloprid	CK	0.687 ± 0.015 b	0.872 ± 0.015 a	0.911 ± 0.077 a	0.884 ± 0.061 b	1.015 ± 0.078 b
	12.5	0.791 ± 0.041 a	0.934 ± 0.041 a	0.916 ± 0.023 a	0.915 ± 0.047 b	1.198 ± 0.128 b
	25.0	0.789 ± 0.013 a	1.024 ± 0.013 a	0.918 ± 0.063 a	0.955 ± 0.056 ab	1.291 ± 0.171 b
	50.0	0.780 ± 0.045 a	1.003 ± 0.045 a	0.888 ± 0.052 a	1.075 ± 0.023 a	1.327 ± 0.043 a
Carbosulfan	CK	0.829 ± 0.056 a	1.125 ± 0.053 a	1.546 ± 0.164 a	1.725 ± 0.069 ab	1.068 ± 0.081 a
	50	0.959 ± 0.120 a	1.297 ± 0.253 a	1.664 ± 0.226 a	1.412 ± 0.077 b	1.024 ± 0.223 a
	100	0.945 ± 0.073 a	1.208 ± 0.132 a	1.738 ± 0.145 a	1.662 ± 0.177 ab	0.963 ± 0.168 a
	200	1.101 ± 0.240 a	1.351 ± 0.180 a	1.700 ± 0.317 a	1.994 ± 0.190 a	0.934 ± 0.168 a

三种杀虫剂对棉花幼苗中羧酸酯酶活性的影响与对多酚氧化酶的影响有所不同。各浓度氧化乐果在处理120 h内均显著抑制了羧酸酯酶的活性,其影响迅速并持续较长时间不能恢复,而且各处理之间酶活性差异不显著。这表明棉花羧酸酯酶对氧化乐果很敏感。吡虫啉处理则使羧酸酯酶活性显著增高,且随处理时间延长,50 mg/L处理组对酶活性的影响更趋显著。而氨基甲酸酯类药剂丁硫克百威在试验剂量和时间范围内未引起棉花羧酸酯酶活性的改变。可见,不同杀虫剂对棉花羧酸酯酶活性的影响差别很大。

至于药剂对酶活性变化的影响具体是由何种机制引起,以及这种变化是否会对棉花的抗虫抗病性等抗逆能力产生一定的影响,还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Ludlum C T, Felton G W, Duffey S S. Plant defenses: chlorogenic acid and polyphenol oxidase enhance toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* to *Heliothis zea* [J]. *J Chem Ecol* 1991, 17(1): 217-237.

[2] WU Xue-hong(吴学宏), LI Fei-wu(李飞武), ZHANG Wen-hua(张文华), et al. 咯菌清对西瓜幼苗生长及抗病性相关酶活性的影响 [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2004, 34(6): 531-535.

[3] ZHUANG Jing-hua(庄敬华), GAO Zeng-gui(高增贵), YANG Chang-cheng(杨长城), et al. 绿色木霉菌 T23 对黄瓜枯萎病防治效果及其几种防御酶活性的影响 [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2005, 35(2): 179-183.

[4] WANG Hong-liang(王洪亮), WANG Qing-lian(王清连). 棉花多酚氧化酶对棉蚜为害的反应 [J]. *J Henan Vocational-Technical Teachers College* (河南职业技术学院学报), 2001, 29(2): 1-2.

[5] LI Yue-qiang(李跃强), SHENG Cheng-fa(盛承发). 叶型超补偿下棉花叶中保护酶活性的变化 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2004, 47(6): 780-786.

[6] Inckdon B J, Hall J C. Enzymatic deesterification of xenobiotics in plants [A]. Regulation of Enzymatic System Detoxifying Xenobiotics in Plants [C]. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997, 37: 67-82.

[7] Hashim R, Ravon M, Cole D J et al. The identification and properties of apoplastic carboxy esterase from wheat that catalyze deesterification of herbicides [J]. *Pestic Biochem Physiol* 2001, 71: 178-189.

[8] Canal M J, Sanchez Tam s R, Fernandez B. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in *Cyperus esculentus* leaves following glyphosate application [J]. *Physiologia Plantarum*, 1988, 74: 125-130.

[9] Youngman R R, Leigh T F, Kerby T A, et al. Pesticides and cotton: effect on photosynthesis, growth, and fruiting [J]. *J Econ Entomol* 1990, 83(4): 1549-1557.

[10] Sayed T A R, Bekl M H, Gupta G. Photosynthesis inhibition of soybean leaves by insecticides [J]. *Environmental Pollution*, 1991, 74: 245-250.

[11] Johnson M W. Lettuce yield reductions correlated with methyl parathion use [J]. *J Econ Entomol* 1983, 76(6): 1390-1394.

[12] LIANG Pei(梁沛), MENG Feng-xia(孟凤霞), GAO Xi-wu(高希武). 小菜蛾多酚氧化酶生物化学性质研究 [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2003, 46(5): 553-557.

[13] van Asperen K. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method [J]. *J Insect Physiol* 1962, 8: 401-416.

[14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.

(Ed. TANG J)