

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.02.24

3 种抑制剂对褐色橘蚜乙酰胆碱酯酶活性的影响

牟 星 王进军*

(西南大学植物保护学院, 昆虫学及害虫控制工程重庆市重点实验室, 重庆 400716)

摘要: 乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE; EC3.1.1.7) 作为有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标, 一直是昆虫毒理学领域研究的热点。本研究采用微量滴度酶标板法研究了褐色橘蚜 *Toxoptera citricida* 不同发育阶段 AChE 的生化特性及个体活性频率, 离体条件下分析了 3 种药剂对 AChE 的影响。结果表明, 无翅成蚜对底物碘化硫代乙酰胆碱亲和力显著高于若蚜; 就个体活性分布频率而言, 25%–30% 的无翅成蚜分布在 9.5–10.5 nmol/(min·insect) 区间, 而 50%–55% 的若蚜分布在 2–3 nmol/(min·insect) 区间; 离体条件下, 毒扁豆碱、残杀威、异丙威等 3 种杀虫剂对褐色橘蚜 AChE 有显著的抑制作用, 与成蚜相比, 若蚜 AChE 对 3 种药剂更敏感, 而毒扁豆碱对褐色橘蚜无翅成蚜与若蚜 AChE 的抑制作用最好。本研究表明褐色橘蚜成蚜与若蚜生化特性及对药剂的敏感性存在显著差异。

关键词: 褐色橘蚜; 乙酰胆碱酯酶; 动力学; 离体抑制

中图分类号: Q965.9; S433.39

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 02-0401-07

Effect of three insecticides on acetylcholinesterase of *Toxoptera citricida* *in vitro*

MOU Xing, WANG Jin-Jun* (College of Plant Protection, Southwest University, Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, Chongqing 400716, China)

Abstract: Acetylcholinesterase (AChE) plays an important role in the nervous impulse of natural species. The biochemical and toxicological characteristics of AChE from *Toxoptera citricida* wingless adult and nymph were studied in the laboratory applying microplate reader assay. The results showed that AChE from wingless adult aphid on substrate affinity was significantly higher than that of nymphs. As for the individual distribution of AChE activity in frequency, 25%–30% of wingless adults are distributed in the range of 9.5–10.5 nmol/(min·insect), 50%–55% of nymphs are focused on the range of 2–3 nmol/(min·insect). Besides, all three kinds of inhibitors significantly inhibited AChE from *T. citricida* wingless adults and nymphs. Compared to the counterparts of wingless adults, AChE from nymphs is more sensitive to insecticides. Among the insecticides, serine exhibited best inhibition effect on the activity of AChE from *T. citricida*. The current research showed that biochemical properties and the insecticide sensitivity of AChE from *T. citricida* wingless adult and nymph were significantly different.

Key words: *Toxoptera citricida*; AChE; kinetics; *in vitro* inhibition

柑橘蚜虫属半翅目 Hemiptera 蚜科 Aphididae, 在我国造成危害的有 10 余种, 主要有褐色橘蚜

Toxoptera citricidus 和橘二叉蚜 *T. aurantii* 等 (吕佩珂等, 2002)。柑橘蚜虫在我国分布极广, 所有种

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划 (201210635036); 重庆市自然科学基金重点基金 (CSTC2013jjB0176)

作者简介: 牟星, 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生化毒理学, E-mail: 865662881@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wangjinjun@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-07-08; 接受日期 Accepted: 2015-07-30

植区均有发生,主要为害柑橘的嫩枝梢,吸食营养液,嫩组织受害后,形成凹凸不平的皱缩,排泄的蜜露常导致煤烟病发生,影响果实品质和产量(罗源华,2009),并且可以传播植物病毒,如柑橘衰退病毒 *Citrus tristeza virus* (CTV)。CTV除了通过带毒繁殖材料进行嫁接传播以外,在田间主要通过蚜虫如褐色橘蚜、棉蚜 *Aphis gossypii* 和橘二叉蚜等以非循环型半持久方式进行传播,导致CTV流行(李玲娣等,2012)。柑橘蚜虫个体发育为不完全变态:营孤雌生殖的,只有若虫和成虫两个阶段,行两性生殖的,则有卵、若虫和成虫3个阶段;其生活周期,仅营孤雌生殖的称为“不全周期”;交替进行的称为“全周期”;繁殖力强,世代历期短,年发生世代多达数十代,且世代重叠(罗源华,2009)。受气候及柑橘本身生长影响,在重庆多在春季严重为害柑橘。根据已有资料显示,随着马拉硫磷等杀虫剂的过量施用,害虫对药物的敏感性发生变化并产生一定抗性(赵霞等,2013)。近年来,褐色橘蚜对于药剂的抗性逐渐显现,危害柑橘更加严重,并上升为主要害虫。随着化学药剂的不合理使用,柑橘上害虫抗性逐渐凸显。

乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE; EC3.1.1.7) 作为一种丝氨酸水解酶,在脊椎和无脊椎动物正常的神经传导活动中起着重要的作用,它能够迅速水解兴奋性神经递质乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 从而保持神经突触传导的正常进行 (Fournier *et al.*, 1994; Hama, 1983)。高希武等对棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、彭宇等对二化螟 *Chilo suppressalis*、叶东平对葱蝇 *Delia antiqua*、肖丽莎对嗜虫书虱 *Liposcelis entomophila* 与嗜卷书虱 *Liposcelis bostrychophila* 的 AChE 进行了提取和纯化并研究了其特性;星豹蛛 *Pardosa astrigera* 的 AChE 可有效被灭多威、辛硫磷、高效氯氟菊酯、毒死蜱等药剂抑制。在昆虫中, AChE 是有机磷 (Organophosphate, OPs) 和氨基甲酸酯类 (Carbamate, CBs) 杀虫剂的重要作用靶标。作为 AChE 的抑制剂,有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂能抑制 AChE 水解乙酰胆碱,使乙酰胆碱结合在乙酰胆碱受体 (AChR) 上,造成过量的乙酰胆碱累积在突触处, AChR 的功能无法恢复,从而导致正常的神经传导受阻,神经传导的阻断必然会影响整个生理生化过程的失调与破坏,最终造成昆虫的死亡。

有关 AChE 生化特性的研究多集中在同种昆虫

敏感和抗性品系间、不同地理种群之间或是近似种之间 (Zhu and Clark, 1997; Cheng *et al.*, 2004; Moores *et al.*, 1996; 陶卉英等, 2005)。AChE 在昆虫不同发育阶段的活性差异已有研究,目前已先后在粉斑螟 *Ephestia cautella* (Al-Hakkak *et al.*, 1989)、棉铃虫 (Gao *et al.*, 1996)、二化螟 (彭宇等, 2002)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (李腾武等, 2005)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst) (刘国瑛等, 2007)、黄粉虫 *Tenebrio molitor* L. (叶榕村, 2010) 中发现 AChE 的活性与昆虫的发育阶段紧密相关。本文对褐色橘蚜若蚜和成蚜两个发育阶段之间 AChE 的生化及毒理学特性进行了较为系统的比较研究。通过分析 AChE 在褐色橘蚜不同发育阶段的差异,进一步研究 AChE 酶学性质及其在该虫生长发育过程中的生理功能,为开发以该酶为靶标的杀虫剂提供基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

试验所用褐色橘蚜于 2013 年 4 月下旬至 5 月上旬采集于重庆市西南大学后山柑橘网室中,此柑橘网室连续几年未曾打药,蚜虫在自然条件下生长。采集后以成虫进行繁殖并在人工气候室 (恒温 $27^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50%–75%, 14:10 光照条件,柑橘幼苗上不施加任何药剂) 建立室内种群以备后续使用。

1.2 主要试剂

碘化硫代乙酰胆碱 [Acetylthiocholine iodide (ATChI)] 和二硫双对硝基苯甲酸 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 订购于美国 Fluka 化学试剂公司。考马斯亮蓝 G-250 (Coomassie brilliant blue G-250) 订购于上海化学试剂公司。牛血清白蛋白 (Albumin bovine serum) 订购于上海伯奥生物科技公司。99% 毒扁豆碱 serine、99% 残杀威 propoxur、异丙威 isoprocarb 生产于美国 Sigma-Aldrich 化学试剂公司。

1.3 乙酰胆碱酯酶活性测定及计算

参照 Ellman (Ellman *et al.* 1961) 方法并加以改进。

1.3.1 蛋白质标准曲线制备

参照 Bradford (Bradford, 1976) 考马斯亮蓝 G-250 方法,用考马斯亮蓝染色,以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白。取各浓度的牛血清白蛋

白溶液 50 μL 与 200 μL 考马斯亮蓝 G-250 染色液于酶标板中充分混合均匀后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、595 nm 条件下测其 OD 值, 以每孔的蛋白含量 (μg) 为横坐标, OD 值为纵坐标绘制得到标准曲线。

1.3.2 酶源制备

分别挑取大小一致的褐色橘蚜成蚜 20 头, 若蚜 (2 龄) 30 头, 用 2000 μL 0.1 M, pH7.0 冰预冷的磷酸缓冲液 (含 1 M NaCl, 1% Triton-X) 于冰浴条件下充分匀浆, 匀浆液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 g 先粗离心 5 min, 弃去沉淀, 上清液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、17500 g 条件下再次离心 25 min, 得上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 除去脂肪, 收集得到粗酶液。

1.3.3 蛋白含量测定

取 50 μL 待测酶液, 再加入 200 μL 考马斯亮蓝 G-250 染色液, 充分混合均匀以后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、595 nm 条件下测其 OD 值。根据标准曲线可求出褐色橘蚜体内蛋白质含量。

1.3.4 AChE 比活力测定

参照 Ellman (1961) 方法并加以改进。

在酶标板加样孔中加入 50 μL 0.1 M、pH7.0 磷酸缓冲液, 100 μL 1.5 mM ATChI 和 100 μL 0.3 mM DTNB, 最后取待测酶液 50 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、412 nm 条件下测定其 OD 值, 扫描 10 min, 每分钟读一次数, 记录数据, 计算 AChE 的活力和比活力。活力由 AChE 反应速率 (mOD/min) 表示。根据 AChE 能催化 ATChI 水解产生硫代胆碱和乙酸, 硫代胆碱与 DTNB 结合生成黄色的 5-硫-2-硝基苯甲酸盐离子, 此物质在 412 nm 处有最大吸收峰的特性。

$$\text{AChE 比活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mgpro}) = \frac{\text{OD} \times R \times 1000}{e \times S \times W \times P}$$

式中, OD 为平均吸光度, OD₄₁₂ nm/min; e 为摩尔消光系数, 13600 $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; S 为待测样品体积 (μL); R 为反应总体积 (μL); W 为蛋白质含量 (μg); P 为光穿透长度 (0.6 cm)。

1.3.5 AChE 动力学参数 (K_m 和 $V_{\max}$) 的测定

在酶标板加样孔中依次加入 0.1 M、pH7.0 磷酸缓冲液、待测酶液、不同浓度的 ATChI 以及 DTNB。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、412 nm 条件下测其 OD 值, 计算 AChE 的比活力, 参考 Wilkinson (1961) 的方法通过双倒数作图法求得动力学参数 K_m 和 $V_{\max}$ 值。

1.3.6 褐色橘蚜不同虫态 AChE 活性个体分布频率比较

先后挑取 100 头大小一致的无翅褐色橘蚜成

蚜及若蚜进行单头匀浆, 分别加入 0.1 M, pH7.0 的磷酸缓冲液 0.4 mL, 在冰水中匀浆, 匀浆液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、17500 g 下离心 25 min, 上清液作为酶源。活性按 1.3.4 方法进行测定。

1.3.7 AChE 离体抑制作用的测定

先用丙酮将毒扁豆碱、残杀威、异丙威抑制剂配制成 0.01 M 母液, 试验时用 0.1 M、pH7.0 的磷酸缓冲液稀释成各所需浓度。在酶标板加样孔中加入 50 μL 待测酶液、30 μL 抑制剂及 20 μL 0.1 M、pH7.0 磷酸缓冲液再在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 10 min 后加入 100 μL ATChI 和 100 μL DTNB, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、412 nm 下测定其 OD 值, 计算 AChE 的残留活力。以不加入抑制剂的为对照。根据抑制率的几率值与抑制剂终浓度的负对数进行直线回归分析, 求得抑制中浓度 (I_{50})。

$$\text{酶液的抵制}(\%) = \frac{\text{对照 OD} - \text{处理 OD}}{\text{对照 OD}} \times 100$$

1.4 数据统计分析

采用 Excel 和 SPSS 16.0 分析软件对数据进行处理。应用独立 T 测验方差分析方法 (independent T test) 分析酶活力及动力学参数等之间的差异结果与分析。图表中数据采用 Mean $\pm$ SD 表示, 显著水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 褐色橘蚜 AChE 活力及动力学参数分析

褐色橘蚜无翅成蚜与若蚜的蛋白含量分别为 0.251、0.166 mg/insect, AChE 活力分别为 2.762、2.157 nmol/min, 比活力分别为 0.263、0.205 nmol/min/mg, 统计分析结果表明: 褐色橘蚜无翅成蚜的蛋白含量、AChE 活力及比活力均显著高于若蚜 ($P < 0.05$, 表 1); 褐色橘蚜无翅成蚜与若蚜 AChE 的 K_m 显著低于若蚜 ($P < 0.05$, 表 2), 为 0.059 mM, 即对底物的亲和力高于若蚜, 而 $V_{\max}$ 值高于若蚜 ($P > 0.05$, 表 2), 为 0.278 nmol/min/mg。

2.2 褐色橘蚜不同虫态 AChE 活性个体分布频率比较

对褐色橘蚜不同虫态进行单头乙酰胆碱酯酶活性测定, 统计不同活性段内的褐色橘蚜个体分布频率, 结果见图 1。褐色橘蚜无翅成蚜个体的活性主要分布在 6.5 – 11.5 nmol / (min · insect), 分布高峰在 9.5 – 10.5 nmol / (min · insect)。若蚜个体的活性主要分布在 1 – 6 nmol / (min · insect),

表1 褐色橘蚜 AChE 活力及比活力
Table 1 AChE activity and specific activity
of *Toxoptera citricida*

虫态 Insect stage	蛋白含量 Protein (mg/insect)	活力 Activity (nmol/min)	比活力 Specific activity (nmol/min/mg)
无翅成蚜 Wingless adult	0.251 ± 0.011 a	2.762 ± 0.283 a	0.263 ± 0.027 a
若蚜 Nymph	0.166 ± 0.004 b	2.157 ± 0.246 b	0.205 ± 0.020 b

注: 结果表示为平均值 ± 标准差 (n = 3); 平均值后的不同字母表示同一列的校正比活力有显著差异 ($P < 0.05$, t 测验)。下表同。Note: Each value represented the mean (Mean ± SD) of three replications. Means within the same column followed by different letters were significantly different ($P < 0.05$, independent t test). The table same below.

表2 褐色橘蚜 AChE 动力学参数
Table 2 AChE kinetic parameter of *Toxoptera citricida*

虫态 Insect stage	ATCHI	
	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/mg)
无翅成蚜 Wingless adult	0.059 ± 0.006 a	0.278 ± 0.026 a
若蚜 Nymph	0.108 ± 0.016 b	0.265 ± 0.033 a

分布高峰在 2–3 nmol / (min · insect)。说明无翅成蚜 AChE 的活性普遍高于若蚜, 而若蚜的个体活性更加集中。

2.3 3 种药剂抑制中浓度的测定

根据 1.3 方法测定 3 种农药对褐色橘蚜 AChE 的抑制活性, 得出不同浓度的农药对褐色橘蚜 AChE 的抑制百分率。

根据药剂对 AChE 抑制的剂量效应关系, 可以求出 3 种农药的抑制中浓度 (I_{50}) (表 3)。无翅成蚜毒扁豆碱、残杀威、异丙威三者的 I_{50} 分别为 0.186、0.989、0.296 μM , 若蚜毒扁豆碱、残杀威、异丙威三者的 I_{50} 分别为 0.124、0.594、0.234 μM 。由统计分析数据可知, 毒扁豆碱、残杀威、异丙威对褐色橘蚜无翅成蚜 AChE 的抑制作用的强弱顺序为: 毒扁豆碱 > 异丙威 > 残杀威。

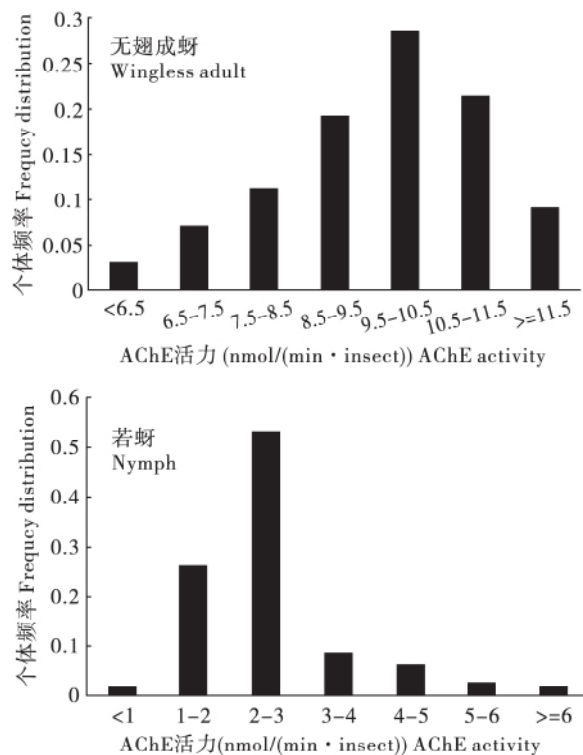


图1 褐色橘蚜不同虫态 AChE 活性个体分布频率

Fig. 1 Frequency distribution of AChE activity in *Toxoptera citricida* in different stage

表3 三种抑制剂对褐色橘蚜 AChE I_{50} 比较
Table 3 Three inhibitors to acetylcholinesterase of *Toxoptera citricida* in vitro

抑制中浓度 (μM) LC_{50} (I_{50})	虫态 Insect stage	
	无翅成蚜 Wingless adult	若蚜 Nymph
毒扁豆碱 Eserine	0.186 ± 0.012 a	0.124 ± 0.027 b
残杀威 Propoxur	0.989 ± 0.117 a	0.594 ± 0.094 b
异丙威 Isoprocarb	0.296 ± 0.010 a	0.234 ± 0.030 b

3 结论与讨论

AChE 是生物神经传导中一种关键性酶, 它通过迅速水解神经递质 ACh 而终止突触传递。同一生物不同时期 AChE 分子大小、形状、溶解性等理化性质存在差异, 有些昆虫 AChE 活性随着龄期增加而增加 (张友军等, 1997), 如粉斑螟 (Al -

Hakkak *et al.*, 1989)、二化螟(彭宇等, 2002)、小菜蛾(李腾武等, 2005)、黄粉虫(叶榕村, 2010)等。本研究得出的褐色橘蚜成蚜活力与比活力高于若蚜与这些昆虫的研究结果一致; 而有些昆虫 AChE 活性随着龄期增加而减弱(张丽等, 2002), 如赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (刘国瑛等, 2007), Casida (1955) 曾做过的研究结果也与之一致; 但棉铃虫 *Helicoverpa armigera* AChE 的比活力在幼虫期呈现两个高峰, 一个在三龄, 另一个在化蛹前; 在蛹期 AChE 比活力没有明显的变化, 而比活力值比较低; 到成虫期第 4 天有一个明显的高峰, 比活力值高于其他虫态 (Gao *et al.*, 1996)。上述结果表明, 不同昆虫在其生长发育过程中体内的 AChE 变化趋势是存在一定差异的。

本文研究结果显示, 无翅成蚜与若蚜 AChE 动力学参数差异显著, 米氏常数 K_m 能反映 AChE 与底物的亲和力大小, K_m 大说明复合物易解离, 也即酶对底物的亲和力小, K_m 小则反映为酶对底物的亲和力大。 K_m 值作为酶的特征常数, 只与酶的性质有关, 因而更能体现 AChE 的特性。褐色橘蚜无翅成蚜 AChE 的 K_m 小于若蚜, 则其对底物 ATChI 的亲和力大于若蚜。此结果证明了随褐色橘蚜的生长发育, AChE 活力增强, 亲和力提高。在研究昆虫抗药性方面时, K_m 也是一个十分重要的常数, 抗性昆虫 AChE 一般对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的亲和力下降 (Vontas *et al.*, 2001), 即 K_m 值上升。但也有部分研究发现, 西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 抗性品系的变构 AChE 其对底物的水解能力和亲和力与敏感品系相比没有发生改变 (Zhao *et al.*, 1993), 甚至在棉铃虫和棉蚜抗性品系中发现变构 AChE 对底物的亲和力升高, K_m 值下降 (Dong *et al.*, 2000)。此外, 棉蚜 5 个抗性品系的 AChE 研究发现, AChE 的 K_m 值下降可能与负交互抗性有关, 一种变异可能导致对某一底物的亲和力上升, 而对另一底物的亲和力却下降 (Li *et al.*, 2003)。

从个体频率分布图看出, 褐色橘蚜 AChE 活性个体间存在差异, 无翅成蚜比若蚜更为分散, 且无翅成蚜活性整体普遍高于若蚜, 表明同一种群内不同个体间 AChE 存在一定程度的异质性, 且更能体现对褐色橘蚜整体活性的认识, 如对烟粉虱 *Bemisia tabaci* 及温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (杨秀清等, 2001)、桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) (帅霞, 2005) 的 AChE 活性个

体频率分布的研究。了解成蚜与若蚜的抗性机制的差异对于褐色橘蚜的化学防治和综合治理有重要意义。

AChE 是昆虫中枢神经系统突触中主要神经递质—乙酰胆碱的分解酶, 同时还是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的靶标 (唐振华等, 1993)。在本实验中, 根据抑制中浓度 (I_{50}) 可以看出, 3 种抑制剂对褐色橘蚜两种虫态 AChE 均有显著的抑制作用 (见表 3), 其抑制能力存在显著差异。从 3 种抑制剂的抑制效果来看, 毒扁豆碱对褐色橘蚜 AChE 的离体抑制作用最强, 其次依次为: 毒扁豆碱 > 异丙威 > 残杀威, 残杀威对褐色橘蚜 AChE 的离体抑制作用最弱。从表中也可以看出, 褐色橘蚜对药剂的敏感性随生长发育而逐渐降低, 与此同时, AChE 活性逐渐增强, 与不同发育阶段对药剂的敏感性呈负相关。许多试验表明, AChE 对杀虫剂的敏感性降低, 常常伴随其酶活力的降低 (张文吉等, 1996)。本研究与王泽华等 (2014) 对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 的研究结果相同, 由此推测 AChE 活力与昆虫本身和药剂的接触程度有关, 不同昆虫 AChE 活力的变化与对杀虫剂的敏感性变化是不同的。

当前研究表明, 与若蚜相比, 褐色橘蚜成蚜 AChE 对三种药剂的敏感性下降, 即需要更大剂量的药剂来抑制成蚜 AChE。因此在实际生产中, 褐色橘蚜的防治应尽量在若蚜期进行。

参考文献 (References)

- Al-Hakkak ZS, Al-Azzawi MJ, Al-Adhemy BW, *et al.* Inhibitory action of phosphine on acetylcholinesterase of *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Journal of Stored Products Research*, 1989, 25 (3): 171-174.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1): 248-254.
- Casida JE. Comparative enzymology of certain insect acetylsterases in relation to poisoning by organophosphorus insecticides [J]. *Biochemical Journal*, 1955, 60 (3): 487.
- Cheng WX, Wang JJ, Ding W, *et al.* Inhibition kinetics on carboxylesterase and acetylcholinesterase of *Liposcelis bostrychophila* and *Liposcelis entomophila* (Psocop., Liposcelididae) of two insecticides [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2004, 128 (4): 292-297.
- Dong Y, Tang Z. Molecular mechanisms of target resistance in the organophosphate and pyrethroid resistant *Helicoverpa armigera* (Hubner) [J]. *Entomologia Sinica*, 2000, 7 (1): 58-64.

- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7 (2): 88–95.
- Fournier D, Mutero A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part C): Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1994, 108 (1): 19–31.
- Gao XW, Zheng BZ, Zhang F, *et al.* Substrate specificity and developmental changes of acetylcholinesterase in Cotton bollworm [J]. *Insect Science*, 1996, 3 (1): 80–89.
- Gao XW, Zhou XG, Wang RJ, *et al.* Distribution and purification of acetylcholinesterase in Cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1998, 1: 21–27. [高希武, 周序国, 王荣京, 等. 棉铃虫乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的体躯分布及部分纯化 [J]. *昆虫学报*, 1998, 1: 21–27]
- Hama H. Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase [J]. *Pest Resistance to Pesticides*, 1983: 299–331.
- Li F, Han ZJ, Tang B. Insensitivity of acetylcholinesterase and increased activity of esterase in the resistant cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2003, 46 (5): 578–583. [李飞, 韩召军, 唐波. 抗性品系棉蚜乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶的变异 [J]. *昆虫学报*, 2003, 46 (5): 578–583]
- Li LD, Zhou CY, Li ZA, *et al.* Development and application of a real-time RT-PCR approach for quantification of CTV in *Toxoptera citricida* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 46 (3): 525–533. [李玲娣, 周常勇, 李中安, 等. 褐色橘蚜中柑橘衰退病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用 [J]. *中国农业科学*, 2012, 46 (3): 525–533]
- Li TW, Shen FY, Zhao XZ, *et al.* Study on acetylcholinesterase properties of the different populations of *Plutella xylostella* [J]. *China Plant Protection*, 2005, 25 (4): 5–7. [李腾武, 沈福英, 赵晓珍, 等. 不同种群小菜蛾乙酰胆碱酯酶性质研究 [J]. *中国植保导刊*, 2005, 25 (4): 5–7]
- Liu GY, Chai YX, Wei DD, *et al.* Toxicological and biochemical characterization of acetylcholinesterase in *Tribolium castaneum* (Herbst) [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 22 (12): 303–306. [刘国瑛, 柴玉鑫, 魏丹丹, 等. 赤拟谷盗乙酰胆碱酯酶生化及毒理学特性研究 [J]. *中国农学通报*, 2007, 22 (12): 303–306]
- Luo YH. 8% carbosulfan + acetamipridmissible oil against Citrus aphid field efficacy test [J]. *Hunan Agricultural Science*, 2009, 8: 79–80. [罗源华. 8% 丁硫克百威 + 啉虫脒乳油防治柑橘蚜虫田间药效试验 [J]. *湖南农业科学*, 2009, 8: 79–80]
- Lv PK, Su HL. Color Atlas of Fruit Diseases and Pests China (Second Edition) [M]. Beijing: Huaxia Press, 2002, 530–531. [吕佩珂, 苏慧兰. 中国果树病虫害原色图谱 (第二版) [M]. 北京: 华夏出版, 2002, 530–531]
- Ma M, Zhang B, Ge YZ, *et al.* Determination of activity of acetylcholinesterase in *Pardosa astrigera* and the inhibition effect of pesticide on its activity [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 39 (6): 3362–3364. [马敏, 张斌, 葛衍珍, 等. 星豹蛛乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定及药剂对其活性的抑制作用 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 39 (6): 3362–3364]
- Moore G, Gao XW, Ian D, *et al.* Characterisation of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant Cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1996, 56 (2): 102–110.
- Peng Y, Wang YC, Han ZJ, *et al.* Distribution and purification of acetylcholinesterase in *Chilo suppressal* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2002, 45 (2): 209–214. [彭宇, 王荫长, 韩召军, 等. 二化螟体内乙酰胆碱酯酶的分布及纯化方法 [J]. *昆虫学报*, 2002, 45 (2): 209–214]
- Shuai X, Wang JJ. Change in esterase activity and content during the selection of resistance to alphasethrin in *Myzus persicae* [J]. *Zoological Research*, 2005, 26 (1): 101–105. [帅霞, 王进军. 桃蚜高效氯氰菊酯抗性选育过程中酯酶含量和活性变化 [J]. *动物学研究*, 2005, 26 (1): 101–105]
- Tang ZH, Zhou CL. The role of detoxication esterases in insecticide resistance of diamondback moth *Plutella xylostella* larvae [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1993, 36 (1): 8–13. [唐振华, 周成理. 解毒酯酶在小菜蛾幼虫抗药性中的作用 [J]. *昆虫学报*, 1993, 36 (1): 8–13]
- Tao FY, Wang JJ, Ding W, *et al.* Comparison of acetylcholinesterase in the resistant and susceptible strains of *Liposcelis bostrychophila* Badonnel [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2005, 27 (2): 151–154. [陶卉英, 王进军, 丁伟, 等. 嗜卷书虱抗性与敏感品系乙酰胆碱酯酶的比较 [J]. *西南农业大学学报*, 2005, 27 (2): 151–154]
- Vontas JG, Cosmidis N, Loukas M, *et al.* Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2001, 71 (2): 124–132.
- Wang ZH, Shi BC, Kang ZJ, *et al.* The sensitivity of different larval instars of the beet armyworm *Spodoptera exigua* to insecticides and correlation with enzyme activity [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2014, 51 (1): 185–193. [汪泽华, 石宝才, 康总江, 等. 甜菜夜蛾不同龄期幼虫对药剂的敏感性及其与酶活力的关系 [J]. *应用昆虫学报*, 2014, 51 (1): 185–193]
- Wilkinson GN. Statistical estimations in enzyme kinetics [J]. *Biochemical Journal*, 1961, 80 (2): 324.
- Xiao LS. Purification, Biochemical and Toxicological Characterization of Acetylcholinesterase from *Liposcelis entomophila* and *L. bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelididae) [D]. Southwest University, 2010. [肖丽莎. 嗜虫书虱和嗜卷书虱 AChE 的分离纯化及其生化毒理学特性研究 [D]. 西南大学, 2010]
- Xiao LS, Dou W, Wang JJ, *et al.* Biochemical and toxicological characterization of acetylcholinesterase from *Liposcelis entomophila* [J]. *Food Safety and Plant Protection Science and Technology Innovation*, 2010, 415–419. [肖丽莎, 豆威, 王进军, 等. 嗜虫书虱乙酰胆碱酯酶生化及毒理学特性研究 [J]. *粮食安全与植保科技创新*, 2010, 415–419]
- Yang XQ, Gao XW. Comparison of the activity of the enzymes related to insecticide resistance in *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia*

- tabaci [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2001, 3 (4): 38 – 43. 杨秀清, 高希武. 烟粉虱与温室白粉虱羧酸酯酶, 谷胱甘肽转移酶和乙酰胆碱酯酶性质的比较研究 [J]. *农药学报*, 2001, 3 (4): 38 – 43]
- Ye DP. Purification, Biochemical and Toxicological Characterization of Acetylcholinesterase in *Delia antiqua* [D]. Chongqing Normal University, 2011. [叶东平. 葱蝇乙酰胆碱酯酶的纯化及其生化毒理学特性研究 [D]. 重庆师范大学, 2011]
- Ye RC. Distribution and purification of acetylcholinesterase in *Tenebrio molitor* L. [J]. *Journal of Fujian Education Institute*, 2010, 2: 115 – 116. [叶榕村. 黄粉虫体内乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的分布和纯化方法 [J]. *福建教育学院学报*, 2010, 2: 115 – 116]
- Zhang L, Shen XB. Influence of Beta – cypermethrin on activity of acetylcholine esterase and general esterase in *Blattella germanica* [J]. *Chin. J. Vector Bio. & Control*, 2002, 13 (6): 416 – 418. 张丽, 沈孝兵. 高效氯氰菊酯对德国小蠊乙酰胆碱酯酶和非特异性酯酶活性的影响 [J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2002, 13 (6): 416 – 418]
- Zhang WJ, Zhang YJ. Studies on the carboxylesterase glutathione-S-transferase and acetylcholinesterase in different ages of *Helicoverpa armigera* larva [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 1996, 23 (2): 157 – 162. [张文吉, 张友军. 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]
- Zhang YJ, Zhang WJ. Molecular biology of acetylcholinesterase [J]. *Entomological Knowledge*, 1997, 34 (4): 242 – 246. [张友军, 张文吉. 乙酰胆碱酯酶分子生物学研究 [J]. *昆虫知识*, 1997, 34 (4): 242 – 246]
- Zhao G, Liu W, Knowles CO. Diazinon resistance mechanisms in western flower thrips [J]. *Resistant Pest Management*, 1993, 5: 2 – 6.
- Zhao X, Jia M, Wang L, et al. Influence of malathion on detoxification enzymes of *Locusta migratoria manilensis*, Meyen [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2013, 35 (2): 165 – 170. [赵霞, 夹苗, 王磊, 等. 马拉硫磷对东亚飞蝗解毒酶活性的影响 [J]. *环境昆虫学报*, 2013, 35 (2): 165 – 170]
- Zhu KY, Clark JM. Validation of a point mutation of acetylcholinesterase in Colorado potato beetle by polymerase chain reaction coupled to enzyme inhibition assay [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1997, 57 (1): 28 – 35.