

小菜蛾芳基酰胺酶表达及其与呋喃虫 酰肼抗性的关系*

孙璟琰 梁 沛** 高希武

(中国农业大学昆虫学系 北京 100193)

摘 要 以对硝基乙酰苯胺为底物,采用紫外分光光度计比色法,研究了小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 体内芳基酰胺酶酶促反应的最适反应条件、各发育阶段和不同组织中芳基酰胺酶的活性及亚细胞分布及其与小菜蛾对呋喃虫酰肼抗性的关系。结果表明,小菜蛾芳基酰胺酶最适反应条件为 35℃, pH 7.5, 底物浓度为 1.2×10^{-3} mol/L, 反应时间 30 min。利用非变性聚丙烯凝胶电泳活性染色及 SDS-PAGE 法测得小菜蛾芳基酰胺酶的分子量为 61.1 ku。小菜蛾 4 龄幼虫的芳基酰胺酶活性最高。不同亚细胞层中,芳基酰胺酶活力大小依次为线粒体层 > 微粒体层 > 细胞核和细胞碎片层 > 可溶性部分。芳基酰胺酶主要分布在小菜蛾 4 龄幼虫的腹部,其余依次为表皮、头部和胸部。小菜蛾呋喃虫酰肼抗性品系芳基酰胺酶的活性是敏感品系的 3.89 倍,表明该酶参与了小菜蛾对呋喃虫酰肼的抗性形成。

关键词 小菜蛾, 芳基酰胺酶, 反应体系, 发育阶段, 组织分布, 呋喃虫酰肼

The distribution of aryl-acylamidase in the diamondback moth, *Plutella xylostella* and its relationship to fufenozide resistance

SUN Jing-Yan LIANG Pei** GAO Xi-Wu

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The optimum reaction conditions of aryl-acylamidase in *Plutella xylostella* (L.) were determined using 4-nitroanilide as a substrate. The results show that the optimum pH, temperature, substrate concentration and reaction time were 7.5 and 35℃, 1.2×10^{-3} mol/L and 30 min, respectively. The molecular weight of the enzyme is 61.1 ku, as determined by native- and SDS-PAGE. The hydrolyzing activity of aryl-acylamidase was highest in 4th instar larvae and the highest specific activity was in mitochondria. Specific activity was highest in abdomen, followed by the cuticle, head and thorax. Aryl-acylamidase activity of the fufenozide resistant strain was 3.89 times higher than in the susceptible strain, which suggests that aryl-acylamidase is involved in fufenozide resistance in the *P. xylostella*.

Key words *Plutella xylostella*, aryl-acylamidase, optimum reaction condition, tissue distribution, fufenozide

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 是世界范围内十字花科蔬菜的重要害虫。由于其繁殖速度快,世代重叠严重,加之杀虫剂的不合理使用,小菜蛾抗药性发展极为迅速 (Sarfraz *et al.*, 2005)。据统计,目前小菜蛾已对有机磷、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯、苯甲基酰基脲类、双酰肼类等 80 多种不同有效成分的杀虫剂产生了不同程度的抗药性,

已成为抗药性最严重和最难治理的害虫之一。

芳基酰胺酶 (aryl-acylamidase) (EC 3.5.1.3) 广泛存在于动物、植物、微生物和土壤中 (Zablotowicz *et al.*, 1998; Hirase and Matsunaka, 2004; Masson *et al.*, 2007), 可水解带有酰胺基团的化合物 (林浩等, 1986)。已经证明,该酶在害虫的抗药性中起着重要作用 (吴刚和宫田正,

* 资助项目:国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(2012CB114103)、国家自然科学基金项目(30671389, 30971941, 31171873)、公益性行(农业)科研专项(201203038)。

** 通讯作者, E-mail: liangcau@cau.edu.cn

收稿日期:2012-01-17, 接受日期:2012-02-28

1998; Smagghe *et al.*, 2003; Smagghe, 2004; Ninsin and Tanaka, 2005)。

呋喃虫酰肼 (fufenozide), 是国家南方农药创制中心江苏基地发现的双酰肼类昆虫生长调节剂, 对多种鳞翅目害虫如甜菜夜蛾、小菜蛾、斜纹夜蛾等均表现较高的杀虫活性 (李玉峰等, 2003; 张湘宁, 2005)。虽然尚未见到田间小菜蛾种群对该药剂产生抗性的报道, 但通过室内连续筛选, 小菜蛾可对呋喃虫酰肼产生 300 多倍的抗性 (Sun *et al.*, 2010)。然而对其抗性机制并不十分清楚。

本文对小菜蛾芳基酰胺酶进行了系统研究, 明确了其活性测定的最适反应条件及基本生物化学性质, 并测定了其分子量; 对其活性在小菜蛾各发育阶段、亚细胞及主要组织的分布也进行了系统研究, 并比较了呋喃虫酰肼敏感和抗性小菜蛾品系的芳基酰胺酶活性, 以期为深入研究芳基酰胺酶在小菜蛾抗药性中的作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

小菜蛾敏感品系采用蛭石萝卜苗法 (陈之浩等, 1990) 在不接触任何杀虫药剂的情况下室内饲养多代, 抗性品系从敏感品系中用呋喃虫酰肼连续筛选 30 多代获得。饲养条件为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度 60% ~ 70%, 光周期 L:D = 16:8。

1.2 试剂及仪器

对硝基乙酰苯胺 (4-nitroacetanilide) 和对硝基苯胺 (4-nitroaniline), 购自国药集团化学试剂有限公司; 考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白 (BSA)、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购自北京化学公司。

SP-2000UV 型 Spectrum 紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); 5417R 冷冻离心机 (Eppendorf, Germany); Mini protean 3 cell 蛋白电泳仪 (Bio-Rad, USA)。

1.3 酶液制备

取 15 头小菜蛾 4 龄幼虫于预冷的玻璃匀浆器中, 加入 1 mL 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液, 充分匀浆后, 于 10 000 g、4℃ 离心 20 min, 取上清液作为酶源, 冰浴备用。

1.4 小菜蛾芳基酰胺酶反应体系的优化

1.4.1 小菜蛾芳基酰胺酶的活性测定 参照 Yu 和 Valles (1997) 方法, 有修改。在试管中加入

0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液 1.85 mL, 对硝基乙酰苯胺 0.5 mL, 酶液 0.65 mL, 于恒温水浴中反应一定时间后立即置于沸水浴中 10 min 以终止反应。取终止反应后的混合物于 10 000 g 离心 15 min, 取上清液在 405 nm 下测定光密度 (OD) 值, 重复 3 次。对照中加入 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液 1.85 mL, 对硝基乙酰苯胺 0.5 mL, 煮沸的酶液 0.65 mL。

用对硝基苯胺建立标准曲线。酶活性以每分钟每毫克酶蛋白催化生成的对硝基苯胺的纳摩尔数表示, 单位是 nmol/(min·mg pro.)。

1.4.2 最适底物浓度 在 0.05 mol/L, pH 7.5 的磷酸盐缓冲液中, 将浓度为 3×10^{-2} mol/L 对硝基乙酰苯胺溶液依次稀释为 1 400.0、1 200.0、600.0、300.0、150.0、75.0、37.5、18.75 和 9.375 nmol/L 10 个浓度, 在 30℃ 恒温水浴中反应 30 min, 测定芳基酰胺酶活性。重复 3 次。

1.4.3 最适反应时间 在 0.05 mol/L, pH 7.5 的磷酸盐缓冲液中, 以 1.2×10^{-3} mol/L 对硝基乙酰苯胺为底物, 在 30℃ 恒温水浴中分别反应 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130 和 140 min, 测定芳基酰胺酶活性。重复 3 次。

1.4.4 最适反应温度 在 0.05 mol/L, pH 7.5 的磷酸盐缓冲液中, 以 1.2×10^{-3} mol/L 对硝基乙酰苯胺为底物, 分别在 10、20、30、35、40、45、50 和 60℃ 恒温水浴中反应 30 min, 测定芳基酰胺酶活性。重复 3 次。

1.4.5 最适 pH 值 以 1.2×10^{-3} mol/L 对硝基乙酰苯胺为底物, 分别在 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 为 3.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、8.4 和 10.0 时, 于 30℃ 恒温水浴中反应 30 min, 测定芳基酰胺酶活性。重复 3 次。

1.5 小菜蛾芳基酰胺酶分子量测定

采用非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳。分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%。将制备的同一份小菜蛾芳基酰胺酶分为两份, 在同一块凝胶的左、右两边分别加样。浓缩胶电压 80 V, 电泳 80 min, 再于分离胶中电压 100 V, 电泳 3 ~ 4 h。电泳结束后, 将凝胶的左半部分切下置于含有 2×10^{-3} mol/L 的对硝基乙酰苯胺的 50 mL 0.1 mol/L、pH 7.5 巴比妥钠缓冲液中, 37℃ 水浴中进行活性染色; 右半部分于考马斯亮蓝 R-250 中染

色。将考马斯亮蓝染色后与对硝基乙酰苯胺活性染色相对应的条带回收,再进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),测定小菜蛾羧基酰胺酶的分子量,SDS-PAGE 分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%,电泳约 2 h。

1.6 不同发育阶段小菜蛾芳基酰胺酶活性测定

制备敏感品系 1、2、3、4 龄幼虫及预蛹、蛹和成虫的酶液,分别测定其芳基酰胺酶活性,每组重复 3 次。

1.7 小菜蛾芳基酰胺酶的亚细胞分布

于冰水混合物中预冷的玻璃匀浆器中加入约 15 头小菜蛾 4 龄幼虫,1 mL 0.05 mol/L, pH 7.5 磷酸盐缓冲液,充分匀浆后,采用差速离心技术制备各亚细胞组分:1 000 g, 4℃ 离心 15 min 得到的沉淀中含有细胞核和细胞碎片 (C/N), 上清液于 10 000 g, 4℃ 离心 15 min, 沉淀为线粒体 (MC); 所得上清液再于 105 000 g, 4℃ 离心 60 min, 所得沉淀为微粒体 (MS), 上清为可溶性部分 (SF), 分别测定各亚细胞组的芳基酰胺酶活性, 重复 3 次。

1.8 小菜蛾不同组织部位芳基酰胺酶活性测定

在冰上解剖小菜蛾 4 龄幼虫, 分别取其头部、胸部、中肠和腹部, 加入 1 mL 0.05 mol/L, pH 7.5 磷酸盐缓冲液, 充分匀浆后, 10 000 g, 4℃ 离心 20 min 取上清液冰浴备用, 分别测定芳基酰胺酶活性, 重复 3 次。

1.9 呋喃虫酰肼抗性及其敏感品系小菜蛾芳基酰胺酶活性及动力学常数比较

分别从呋喃虫酰肼抗性和敏感品系中选取大小一致的小菜蛾 4 龄幼虫测定其芳基酰胺酶活性, 重复 3 次。

将浓度为 3×10^{-2} mol/L 的对硝基乙酰苯胺溶液依次稀释成 9 个浓度梯度, 分别测定不同底物浓度下的芳基酰胺酶活性, 重复 3 次。用 Enzifit 软件计算最大反应速度 $V_{\max}$ 及米氏常数 K_m 。

1.10 蛋白质含量测定

参照 Bradford (1976) 考马斯亮蓝 G-250 法。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾芳基酰胺酶最适反应条件的优化

2.1.1 最适底物浓度 由图 1(a) 可以看出, 当底物浓度在 $9.375 \times 10^{-6} \sim 7.5 \times 10^{-5}$ mol/L 范围

内, 酶活性随着底物浓度的增加而迅速升高, 当底物浓度在 $7.5 \times 10^{-5} \sim 1.2 \times 10^{-3}$ mol/L 之间时, 酶活性的增长不再和底物浓度的增长成正比。继续加大底物浓度至 1.4×10^{-3} mol/L, 酶活性几乎没有增长, 说明酶已被底物饱和, 其活性不再随底物浓度的增加而增加。因此确定 1.2×10^{-3} mol/L 为小菜蛾芳基酰胺酶最适底物浓度。

2.1.2 最适反应时间 当反应中存在适量底物和酶液时, 在前 30 min 内, 生成的产物量呈线性增加。之后随反应时间延长, 酶活性继续增长, 但不再与时间成线性关系 (图 1:b)。因此, 最佳反应时间定为 30 min。

2.1.3 最适反应温度 以对硝基乙酰苯胺为底物, 在 pH 7.5 条件下测定不同温度下小菜蛾芳基酰胺酶的活性。在 10 ~ 35℃ 范围内, 随着温度升高, 酶活性逐渐升高, 35℃ 时达到最高。此后随温度升高, 酶活力迅速降低 (图 1:c)。故确定其最适反应温度为 35℃。

2.1.4 最适 pH 值 小菜蛾芳基酰胺酶活性在不同 pH 值时变化很大 (图 1:d)。pH 值为 3.0 ~ 5.0 时几乎无活性, 在 pH 5.0 ~ 7.0 时, 酶活性逐渐变大。在 pH 7.0 ~ 7.5 时酶活性迅速上升, 在 pH 7.5 时达到最大。当 pH 值大于 7.5 时, 酶活力呈直线下降趋势。

综上, 确定小菜蛾芳基酰胺酶最适反应条件为 35℃, pH 7.5, 底物浓度为 1.2×10^{-3} mol/L, 反应时间 30 min。

2.2 小菜蛾芳基酰胺酶分子量

SDS-PAGE 结果见图 2。根据标准蛋白分子量, 计算出该酶分子量为 61.1 ku。

2.3 小菜蛾芳基酰胺酶活性在不同龄期的变化

由图 3 可以看出, 在小菜蛾发育的各阶段中, 4 龄幼虫的芳基酰胺酶活性最高 ($P < 0.01$), 其余阶段酶活性较低, 其中 3 龄幼虫酶活力最低。幼虫 1 ~ 3 龄酶活性无明显差异 ($P > 0.05$), 预蛹期、蛹期和成虫酶活性也无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.4 小菜蛾芳基酰胺酶活性的亚细胞分布

实验结果表明, 匀浆液经差速离心后, 在各亚细胞层中, 线粒体层 (10 000 g 沉淀部分) 活性最高, 其次为微粒体层 (105 000 g 沉淀部分), 可溶性部分活性最低 (图 4)。

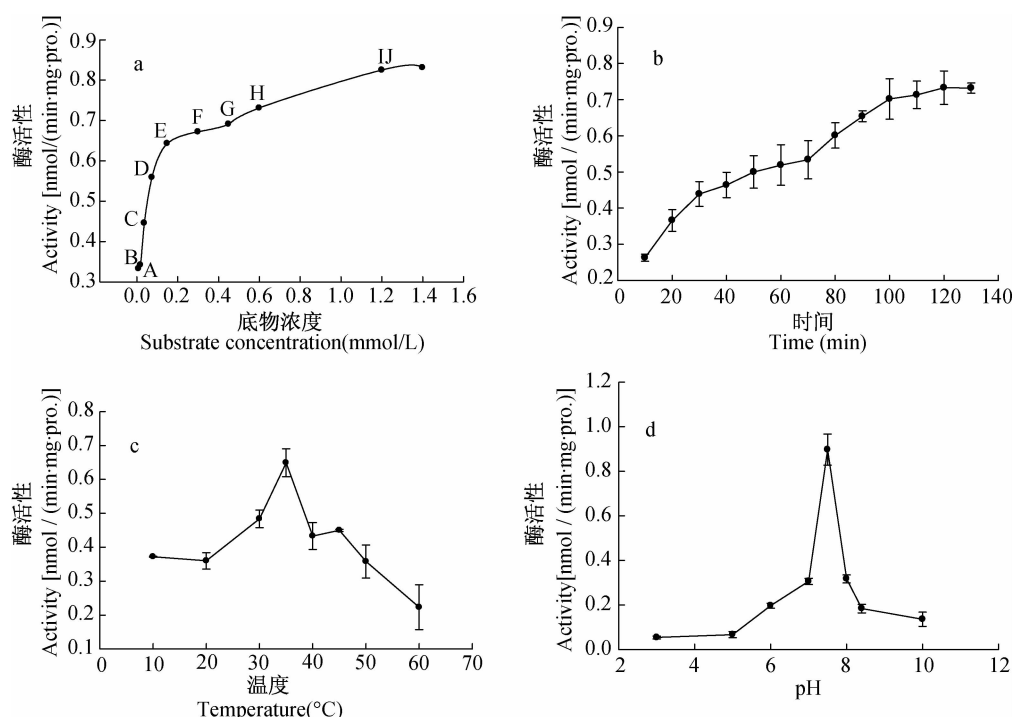


图 1 不同因素对小菜蛾芳基酰胺酶活性测定的影响

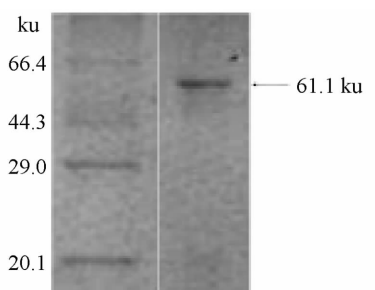
Fig. 1 Effect of different factors on the specific activity of aryl-acylamidase from the 4th instar larvae of the *Plutella xylostella*

图 2 小菜蛾芳基酰胺酶的 SDS-PAGE 图

Fig. 2 SDS-PAGE of aryl-acylamidase from the *Plutella xylostella*

2.5 小菜蛾不同组织部位的芳基酰胺酶活性

对小菜蛾 4 龄幼虫身体各部分芳基酰胺酶的活性测定表明,小菜蛾 4 龄幼虫的头部、胸部、腹部和表皮中均存在芳基酰胺酶,其中腹部活性最高 ($P < 0.05$),其余依次为表皮、头部和胸部(图 5)。

2.6 呋喃虫酰肼敏感和抗性品系的芳基酰胺酶活性比较

对室内选育的呋喃虫酰肼抗性(337.7 倍)及敏感小菜蛾品系的芳基酰胺酶活性进行了测(表

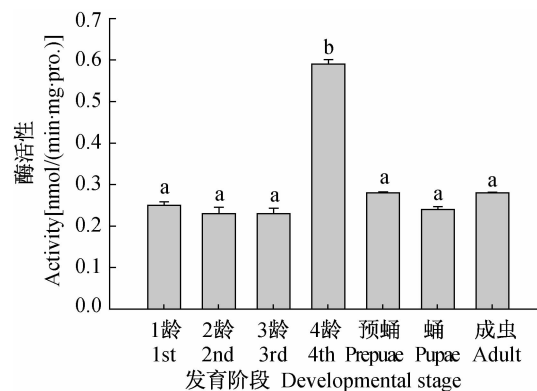


图 3 不同发育阶段小菜蛾芳基酰胺酶的活性

Fig. 3 The aryl-acylamidase activity in different developmental stages of the *Plutella xylostella*

数据上标有不同字母表示差异显著

($P < 0.05$)。下同。

Histograms with different letters indicate significantly different at 0.05 level. The same below.

1)。结果显示,呋喃虫酰肼抗性品系芳基酰胺酶的活性是敏感品系的 3.89 倍,抗性品系芳基酰胺酶的米氏常数 K_m 值则下降为敏感品系的 29.8%,表明抗性品系芳基酰胺酶对底物的亲和力显著增

表 1 小菜蛾呋喃虫酰肼敏感和抗性品系中芳基酰胺酶活性及动力学常数

参数 Parameters	敏感品系 Susceptible strain	抗性品系 Resistant strain	相对比值 Relative ratio
LC ₅₀ (95% FL) (μg /mL)	2. 231 (0. 790—3. 963)	675. 4 (473. 6—1121. 9) *	337. 7
Slope ± SE	1. 240 ± 0. 200	1. 270 ± 0. 215	
Specific activity of aryl-acylamidase [nmol/(min·mg· pro.)]	0. 250 ± 0. 002	0. 973 ± 0. 091 *	3. 89
K _m (× 10 ⁻⁶ mol/L)	5. 113 ± 0. 378	1. 524 ± 0. 124 *	0. 298
V _{max} [nmol/(min·mg ·pro.)]	0. 465 ± 0. 042	0. 372 ± 0. 032	0. 80

数字后标 * 表示在 0. 01 水平上差异显著。
* = significantly different at 0. 01 level.

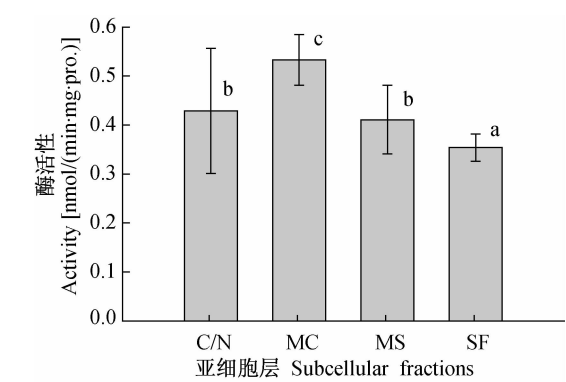


图 4 小菜蛾 4 龄幼虫芳基酰胺酶活性的亚细胞分布
Fig.4 Subcellular distribution of the aryl-acylamidase activity in the 4th instar larvae of the *Plutella xylostella*

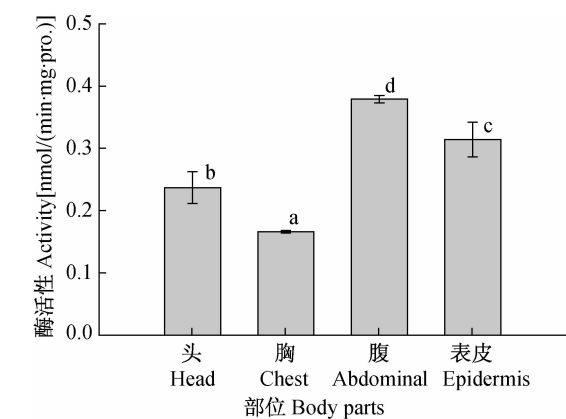


图 5 小菜蛾 4 龄幼虫不同部位的芳基酰胺酶活性
Fig.5 Aryl-acylamidase activity in different body parts of the 4th instar larvae of the *Plutella xylostella*

强。由此推测,芳基酰胺酶活性升高及其对底物亲和力和增强是小菜蛾对呋喃虫酰肼产生抗性的原

因之一。
3 讨论

芳基酰胺酶是生物体内农药及其他外源物质的重要水解酶之一,可以水解含有酰胺基团的农药 (Zablotowicz *et al.* , 1998)。Greenberg-Levy 等 (1995) 根据底物抑制和免疫学研究发现,芳基酰胺酶可以将除虫脲水解为 4 - 氯苯胺。Mahajna 等 (1997) 发现芳基酰胺酶还能够将乙酰甲胺磷水解为甲胺磷。所以,芳基酰胺酶很可能在对含有酰胺键的有机磷类、苯甲基酰基脲类及双酰肼类杀虫剂的代谢中起着重要作用。但是对芳基酰胺酶的天然底物及其在昆虫体内的生理功能方面的研究甚少 (Boopathy *et al.* , 2007)。因此,有必要进一步明确小菜蛾芳基酰胺酶的最适反应条件及其生物化学性质,从而为今后的研究奠定基础。

由于生物间的差异,来源于不同个体或者同一个体不同组织或部位的同一种酶,其活性测定的最适反应条件可能不同 (Thompson, 1999)。昆虫酶的最适 pH 多在 6.5 ~ 8.0 之间,最适 pH 会因昆虫种类以及研究部位的不同而异。本研究测定的小菜蛾芳基酰胺酶反应的最适 pH 为 7.5,与其他昆虫的基本一致。如 Yu 和 Valles (1997) 报道草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 中肠芳基酰胺酶在 pH 值为 8 时酶活性最高;Van Laecke 和 Degheele (1993) 发现甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 末龄幼虫中肠芳基酰胺酶反应的最适 pH 在 7.0 ~ 8.0 之间。

昆虫芳基酰胺酶活性在不同发育阶段或同一发育阶段的不同时期可能有较大的不同。本研究表明,在小菜蛾各发育阶段中,4 龄幼虫体内的芳

基酰胺酶活性最高,其余发育阶段芳基酰胺酶活性都较低,且差异不大。这和刘玉娣等(2002)对小菜蛾幼虫阶段芳基酰胺酶的比活力比较结果相似,作者发现1~3龄幼虫芳基酰胺酶的比活力差异不大,而4龄幼虫比活力为1龄幼虫比活力的1.90倍。Van Laecke 和 Degheele (1993)对甜菜夜蛾同一龄期不同日龄幼虫研究表明,其芳基酰胺酶活性随着幼虫日龄的增长而增加。

对小菜蛾芳基酰胺酶的亚细胞分布研究表明,其芳基酰胺酶的活性在线粒体中最高,这与 Yu 和 Valles(1997)及刘玉娣等(2002)的结果一致。但甜菜夜蛾幼虫中肠在差速离心后得到的可溶性部分活性最高(Van Laecke and Degheele, 1993)。多数研究表明昆虫体内芳基酰胺酶位于腹部,其余部分如头部和表皮有少量分布。本研究同样发现小菜蛾4龄幼虫的头部、胸部、腹部和表皮中均存在芳基酰胺酶,其中腹部活性最高。但林浩等(1986)发现在蓖麻蚕5龄幼虫和成虫脑中,芳基酰胺酶也具有相当高的活力,这可能与芳基酰胺酶调节蓖麻蚕神经系统中的N-乙酰芳胺的量有关。

有关芳基酰胺酶参与害虫抗药性的研究已有报道。Yu 等(2003)发现,田间采集的对西维因和甲基对硫磷的抗性分别为562倍和354倍的草地夜蛾,其脂肪体中芳基酰胺酶的活性高于室内敏感品系。吴刚和宫田正(1998)报道室内筛选的6个抗抑太保品系小菜蛾芳基酰胺酶活性为敏感品系的2.18~2.80倍。上述研究表明芳基酰胺酶参与了昆虫对含有酰胺基团的杀虫药剂的水解代谢。本研究发现,对呋喃虫酰肼高抗(337.7倍)的小菜蛾品系其芳基酰胺酶活性是敏感品系的3.89倍,而相应的 K_m 值则不到敏感品系的30%,表明芳基酰胺酶活性升高及其对底物亲和力增强是小菜蛾对呋喃虫酰肼产生抗性的原因之一。因此,进一步深入研究芳基酰胺酶活与抗药性形成的关系,对于该类药剂的合理使用及田间抗药性治理具有重要理论和实践意义。

参考文献 (References)

Boopathy R, Valmiki R, Darvesh S, Layer PG, 2007. Human serum cholinesterase from liver pathological samples exhibit highly elevated aryl acylamidase activity. *Clin. Chim. Acta*, 380:151—156.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 71: 248—254.

Greenberg-Levy SH, Ishaaya I, Shaaya E, Silhacek DL, Oberlander H, 1995. Hydrolase activity in *Plodia interpunctella*: Use of diflubenzuron and p-nitroacetanilide as substrates. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 52:157—169.

Hirase K, Matsunaka S, 2004. Physiological role of the propanil hydrolyzing enzyme (aryl acylamidase I) in rice plants. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 41 (1):82—88.

Mahajna M, Quistad GB, Casida JE, 1997. Acephate insecticide toxicity: safty conferred by inhibition of the bioactivating carboxylamidase by the metabolite methamidophos. *Chem. Res. Toxicol.*, 10:64—69.

Masson P, Froment MT, Gillon E, Nachon F, Darvesh S, Schopfer LM, 2007. Kinetic analysis of butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetanilides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1774:1139—1147.

Ninsin KD and Tanaka T, 2005. Synergism and stability of acetamiprid resistance in a laboratory colony of *Plutella xylostella*. *Pest. Manag. Sci.*, 61:723—727.

Sarfraz M, Keddle AB, Dosdall LM, 2005. Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: A review. *Biocontrol Sci. Technol.*, 15 (8):763—789.

Smagghe G, 2004. Synergism of diacylhydrazine insecticides with metyrapone and diethylmaleate, *J. Appl. Entomol.*, 128:465—468.

Smagghe G, Pineda S, Carton B, Del Estal P, Budia F, Vinuela E, 2003. Toxicity and kinetics of methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest. Manag. Sci.*, 59:1203—1209.

Sun JY, Liang P, Gao XW, 2010. Inheritance of resistance to a new non-steroidal ecdysone agonist, fufenozide, in the diamondbackmoth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manag. Sci.*, 66:406—411.

Thompson HM, 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates. *Ecotoxicology*, 8 (5):369—384.

Van Laecke K, Degheele D, 1993. Carboxylamidase in *Spodoptera exigua*: properties and distribution in the larval body. *Phytoparasitica*, 21 (1):9—21.

Yu SJ, Nguyen SN, Abo-Elghar GE, 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 77:1—11.

Yu SJ, Valles SM, 1997. Carboxylamidase activity in the fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae) and other Lepidoptera,

- Orthoptera and Dictyoptera. *J. Econ. Entomol.*, 90 (6): 1521—1527.
- Zablotowicz RM, Hoagland RE, Wagner SC, 1998. 2-nitroacetanilide as substrate for determination of aryl acylamidase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 30(6): 679—686.
- 陈之浩, 刘传秀, 李凤良, 韩招久, 1990. 小菜蛾继代繁殖大量饲养方法研究初报. *贵州农业科学*, 4:52—53.
- 李玉峰, 朱丽梅, 倪珏萍, 黄春霞, 张湘宁, 2003. JS-118 的杀虫活性与作用方式研究. *现代农药*, 2 (4):12—13.
- 林浩, 邹伯祥, 许廷森, 1986. 蓖麻蚕芳基酰酰胺酶的研究. *昆虫学报*, 29 (4):351—356.
- 刘玉娣, 赵士熙, 吴刚, 2002. 小菜蛾对抑太保的敏感性及其酰胺酶的活力. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 31 (2):181—183.
- 吴刚, 宫田正, 1998. 酰胺酶在小菜蛾对抑太保抗性中的作用. *福建农业大学学报*, 27 (1):92—95.
- 张湘宁, 2005. 新型昆虫生长调节剂-呋喃虫酰肼. *世界农药*, 27 (4):48—49.