

# 敌百虫对荔枝蜡脂肪体酯酶 及其超微结构的影响

陈文奎 赵善欢

(植保系)

## 提 要

本文研究了荔枝蜡象(*Tessaratoma papillosa* Drury)在不同季节期间脂肪体酯酶活力及其超微结构的特点,并探讨了敌百虫对它们的影响。结果表明:1.碱性磷酸酯酶在新羽化成虫中活力较高,为1.83微克分子/分钟,到越冬期最低,仅0.30微克分子/分钟,在生殖期活力为0.67微克分子/分钟。用敌百虫处理后对酶活力有诱导作用。2.酸性磷酸酯酶的变化与碱性磷酸酯酶不同,从新羽化成虫经越冬到生殖期,酶活力从高逐渐降低,分别为5.7微克分子/分钟,5.47微克分子/分钟和4.8微克分子/分钟。敌百虫处理后其酶活力有所降低。3.羧酸酯酶的活力变化与碱性磷酸酯酶相似,新羽化成虫为1.48毫克分子/分钟,越冬虫为0.42毫克分子/分钟,生殖期为0.72毫克分子/分钟。敌百虫对此酶也有诱导作用。4.新羽化成虫的脂肪体亚细胞结构以液泡为主,越冬期以脂肪、糖原颗粒为多,到生殖期线粒体、粗面内质网大量出现。未观察到敌百虫处理后的生理病变。本文还讨论了有关自然抗药性机理的一些问题。

**关键词** 荔枝蜡象;敌百虫;脂肪体;碱性磷酸酯酶;酸性磷酸酯酶;羧酸酯酶;自然抗药性

## 前 言

荔枝蜡象(*Tessaratoma papillosa* Drury)是荔枝和龙眼上的重要害虫之一,广泛分布于荔枝、龙眼产区。对荔枝蜡象在华南地区的发生为害规律早有较为详细的研究。此虫一年发生一代,以成虫越冬,成虫期长达203~371天。在成虫期,自然抗药性随季节的变化而有较大差异,据华南农学院(1960~1964年)的研究,荔枝蜡象成虫在春夏季,交尾产卵时对敌百虫最敏感,  $LC_{50}$  为0.004%,秋冬季进入越冬后,对敌百虫的抗性最高,  $LC_{50}$  为0.045%,自然抗药性相差可达十余倍<sup>[1]</sup>。

六十年代初,华南农学院植保系根据赵善欢(1961)提出的田间毒理学观点<sup>[2]</sup>,采取田间和室内相结合的研究方法,对荔枝蜡象的发生规律、防治方法、自然抗药性机理等方面进行了一系列的研究,筛选了三十余种杀虫剂,从中找出了效果较好,以敌百

\*电镜照片承蒙本校电镜室陆东雯同志协助拍摄,谨致谢忱。

1987年2月24日收稿

虫、敌敌畏等为代表的杀虫剂数种,并对荔枝蜡象的防治时期及防治策略提出了具体建议<sup>[1]</sup>,有效地解决了生产实际问题,取得了良好的经济效益。敌百虫防治荔枝蜡象,在广东已推广使用二十余年,由于用药合理,加之荔枝蜡象一年仅发生一代,故迄今为止尚未发现荔枝蜡象对敌百虫产生抗药性,这是值得重视并需要进一步深入研究探讨,从中找出具有规律性的东西,供作其他农业害虫防治的借鉴。

已知,昆虫脂肪体是昆虫贮存营养物质,进行中间代谢的重要组织器官<sup>[8][10][11]</sup>,同时具有一定的解毒能力,相当于哺乳动物的肝脏组织<sup>[9]</sup>。但它在荔枝蜡的自然抗药性中究竟起什么作用呢?吴荣宗等(1962)<sup>[1]</sup>曾研究了荔枝蜡象自然抗药性与体内脂肪的相互关系,认为荔枝蜡象对敌百虫的自然抗药性的季节性变化与脂肪体的质和量密切相关。然而并未对脂肪体的酯酶系及超微结构与自然抗药性之间的相互关系进行研究,为了明确这种关系作者对这方面作了一些探索。

## 材 料 和 方 法

### (一) 供试昆虫

从广州近郊果园采回各个不同时期的成虫〔为便于分析、测定,特将成虫分为三个时期:新羽化成虫(6~10月),越冬成虫(11~1月),生殖期成虫(2~5月)〕,置于铁纱笼内饲养,待需要时再取出供试验用。

### (二) 离体酯酶活力测定

1. 酶的制备:取不同时期的荔枝蜡雌成虫各三十头用0.1%敌百虫丙酮稀释液点滴前胸背板(2  $\mu$ l/头),24小时后解剖取样,每十头为一处理,用0.2 mol/L pH7.4磷酸缓冲液2毫升,在冰浴下均浆,然后低温离心10分钟(4,000转/分),取上清液为酶源(浓度为5头/毫升)。正常荔枝蜡象的酶源制备亦与此相同。

2. 碱性磷酸酯酶(EC 3.1.3.1);参照Bessey(1946)<sup>[8]</sup>、陈巧云等(1980)<sup>[4]</sup>方法测定。用对硝基苯基磷酸二钠作底物,配制成 $0.75 \times 10^{-2}$  mol/L水溶液,反应混合物为:1.95毫升0.1 mol/L pH10碳酸钠缓冲液,0.05毫升酶液,0.5毫升底物,摇匀,在27°C水浴保温30分钟后,用1毫升0.1 mol/L NaOH中止反应,在721型分光光度计405毫微米处测光密度值。对照以缓冲液代替酶液。用对硝基苯酚制作标准曲线。

3. 酸性磷酸酯酶(EC 3.1.3.2):除缓冲液改用0.1 mol/L pH4.6醋酸缓冲液外,其余方法同上。

4. 羧酸酯酶(EC 3.1.1.1);参考van Asperen(1962)<sup>[7]</sup>及刘维德等(1983)<sup>[2]</sup>方法。以 $\alpha$ -醋酸萘脂及 $\beta$ -醋酸萘酯为底物,显色剂为坚牢兰B与十二烷基硫酸钠的水溶液。反应混合物:1.95毫升0.1 mol/L pH7.4磷酸缓冲液,0.05毫升酶源,0.5毫升底物,0.5毫升显色剂。27°C水浴保温5分钟。中止反应后在721型分光光度计上用波长600毫微米,测量其光密度值。

### (三) 脂肪体透射电镜材料制备

将正常荔枝蜡象成虫及敌百虫处理后的成虫进行活体解剖,取出围脏脂肪体,分别

投入 4 % 戊二醛溶液中, 在室温下进行真空抽气, 作前固定 2.5 小时, 1 % 锇酸作后固定 2 小时, 然后进行乙醇系列脱水, 环氧丙烷渗透, Epon815 包埋, 45 °C 下聚合 24 小时。60 °C 下聚合 24 小时。在 LKB 超薄切片机上切成 500 Å 的切片, 再用醋酸双氧铀和柠檬酸铝进行染色, 最后在 Phylipp—400 型电镜上观察、摄影。

## 结 果 和 讨 论

### (一) 敌百虫对几种酯酶活力的影响

在不同季节中测定了荔枝蜡象雌成虫几种酯酶的活力变化情况以及 0.1 % 敌百虫处理 24 小时后对这几种酯酶活力的影响, 结果表明:

1. 碱性磷酸酯酶 (ALP, EC 3.1.3.1): 不同时期对这种酶活力的测定结果见表 1。从测定结果可看出, 在正常雌成虫中碱性磷酸酯酶的活力是随着成虫的生长发育而变化的, 在新羽化的成虫中活力较高, 为 1.83 微克分子/分钟, 到越冬期最低, 仅 0.3 微克分子/分钟, 到翌年开春后, 进行交尾产卵时, 活力又逐渐上升到 0.67 微克分子/分钟。酶比活力的变化情况也如此。同时值得注意的是, 在越冬期将结束时, ALP 的活力变化较小。

当用敌百虫处理后, ALP 活力比正常虫还高, 不同季节酶活性增高比分别为 1.17、1.5、1.25。从这一结果可说明敌百虫对荔枝蜡 ALP 活力具有诱导作用, 并且冬季的诱导作用稍高于其他季节

表 1 荔枝蜡雌成虫脂肪体碱性磷酸酯酶活力变化情况

内 容 处 理	酶 源	酶活力* (μ mol/min)					比活力** (μ mol/min/mg)				
		2月	3月	8月	10月	12月	2月	3月	8月	10月	12月
对 照	脂肪体	0.7± 0.06	0.67± 0.04	1.83± 0.01	1.42± 0.02	0.30± 0.06	2.48	5.13	7.22	5.70	1.81
0.1% 敌百虫	脂肪体	0.53± 0.16	0.92± 0.92	2.45± 0.15	1.02± 0.06	0.50± 0.06	2.59	7.12	10.65	6.02	4.20

\* 酶活力系每分钟 ALP 将底物水解生成 4-硝基酚的微克分子数; ± 表示平均标准差 (三次测定值);

\*\* 酶比活力系每毫克蛋白内 ALP 的活力比值。

2. 酸性磷酸酯酶 (ACP, EC 3.1.3.2): 荔枝蜡雌成虫脂肪体内 ACP 的活力变化与 ALP 有所不同, 从表 2 的结果可看出, 自新羽化的成虫到越冬后交尾产卵时, 酶活力从高逐渐降低, 新羽化成虫为 5.7 微克分子/分钟, 越冬成虫为 5.47 微克分子/分钟, 生殖期成虫为 4.8 微克分子/分钟。经敌百虫处理 24 小时后, ACP 的活力有所降低, 分别为 4.17 微克分子/分钟, 4.1 微克分子/分钟, 4.43 微克分子/分钟。从这一结果来看,

敌百虫对ACP的活力有一定的抑制作用。从酶比活力的情况来看则有活力的变化稍有不同, 这可能与脂肪体内蛋白含量的季节有关。

表 2 荔枝雌成虫脂肪体酸性磷酸酯酶活力变化情况

内 容 处 理	酶 源	酶活力* ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )					比活力** ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )				
		2月	3月	8月	10月	12月	2月	3月	8月	10月	12月
对 照	脂肪体	5.0 $\pm$ 0.042	4.8 $\pm$ 0.04	5.7 $\pm$ 0.02	1.87 $\pm$ 0.116	5.47 $\pm$ 0.012	17.73	20.87	22.44	12.81	21.52
0.1% 敌百虫	脂肪体	4.73 $\pm$ 0.02	4.43 $\pm$ 0.052	4.17 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.012	4.1 $\pm$ 0.05	21.19	24.37	18.12	12.13	24.45

\*酶活力系每分钟 ACP 将底物水解生成 4—硝基酚的毫克分子数;  $\pm$  表示平均标准差 (三次测定值);

\*\*酶比活力系每毫克蛋白内 ACP 的活力比值。

3. 羧酸酯酶 (EC 3·1·1·1) 荔枝雌成虫脂肪体内羧酸酯酶活力变化情况, 从表 3 可看出与 ALP 相似, 在正常雌成虫中, 从羽化到交尾产卵, 其酶活力变化从高到低然后再升高, 呈“U”形变化, 即新羽化成虫为 1.48 毫克分子/分钟, 越冬虫为 0.42 毫克分子/分钟, 生殖期成虫为 0.72 毫克分子/分钟。经敌百虫处理 24 小时后, 其酶活力有所上升, 分别为 1.52 毫克分子/分钟, 0.77 毫克分子/分钟和 1.42 毫克分子/分钟。从这一结果可看出, 敌百虫对羧酸酯酶活力有诱导作用。值得注意的是新羽化成虫中敌百虫处理后, 比活力比对照高三倍多。

表 3 荔枝雌成虫脂肪体羧酸酯酶活力变化情况

内 容 处 理	酶 源	酶活力* ( $\text{m mol}/\text{min}$ )			比活力** ( $\text{m mol}/\text{min}/\text{mg}$ )		
		3月	8月	12月	3月	8月	12月
对 照	脂肪体	0.72 $\pm$ 0.002	1.48 $\pm$ 0.005	0.42 $\pm$ 0.002	5.85	3.15	1.67
0.1% 敌百虫	脂肪体	1.42 $\pm$ 0.001	1.52 $\pm$ 0.008	0.77 $\pm$ 0.002	6.59	11.07	3.53

\*酶活力系每分钟羧酸酯酶将底物水解生成  $\alpha$ -萘酚 的毫克分子数;  $\pm$  表示平均标准差 (六次测定值);

\*\*酶比活力系每毫克蛋白内羧酸酯酶的活力比值。

## (二) 敌百虫对脂肪体超微结构的影响

不同时期对荔枝蜡象雌成虫脂肪体超微结构的观察见图 1—6。从这些电镜照片可看出, 新羽化成虫脂肪体不多, 其亚细胞结构以液泡为主, 线粒体和内质网均不太多, 到

越冬时, 亚细胞结构以脂肪颗粒为主, 糖原粒较多, 线粒体极少; 到越冬结束后, 开始交尾产卵时, 脂肪体变化较大, 这时线粒体明显增多, 粗面内质网也大量出现, 细胞内充满核糖核蛋白体, 表明这个时期大量合成蛋白质及其他营养物质, 供生殖活动所需, 代谢水平增高。

经敌百虫处理后的荔枝蠹象雌成虫脂肪体未观察到明显的生理病变。

根据以上研究结果, 我们认为: 昆虫脂肪体虽然对外来化合物具有一定的解毒作用, 但它并不是敌百虫类杀虫剂的作用靶标, 荔枝蠹象的自然抗药性较高时, 脂肪体酯酶类的活力并不随着增高, 相反处于最低水平。尽管在施用药剂处理后, 酯酶活力有被诱导的现象, 但在不同的季节中这种关系并不明显。

刘维德<sup>[2]</sup>曾报道使用双硫磷可诱导抗有机磷的致乏库蚊(*Culex quinquefasciatus*)酯酶活性增强, Wongkobratt<sup>[4]</sup>报道用久效磷能诱导烟草天蛾(*Manduca sexta*)羧酸酯酶活力提高 2 倍。尽管在不同昆虫中或者在获得性抗性与自然抗性中, 对外来化合物有不同反应, 但是在诱导解毒酶系方面却有一定的相似性。特别是有机磷、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯等几类杀虫剂, 能诱导产生酯酶类解毒酶系的现象, 普遍存在于不同种类的昆虫中<sup>[13][15]</sup>。近来还有不少报道抗性与羧酸酯酶的关系<sup>[3][12]</sup>。

荔枝蠹象的自然抗药性是长期环境选择, 不断进化的结果, 是与荔枝蠹象的整个生活史规律, 整个生命系统有关, 并不仅仅是一、二种因子在起作用。同时据作者对荔枝蠹象体壁穿透问题、多功能氧化酶系等方面的研究结果来分析(待发表)、荔枝蠹象自然抗药性与环境因子密切相关, 与荔枝蠹象本身的整体代谢水平有关。

### 引用文献

- [1] 华南农学院昆虫学教研组:《荔枝蠹象毒理生理及防治》, 广东省科学技术情报研究所, 30, 1965年
- [2] 刘维德等: 双硫磷诱导抗有机磷致乏库蚊酯酶活性增强的初步研究, 《昆虫学研究集刊》第三集, 65—72, 上海科学技术出版社, 1982—1983年
- [3] 孙耘芹等: 棉蚜对有机磷杀虫剂抗性的生理机理, 《昆虫学报》30(1) 1981: 13—20
- [4] 陈巧云等: 淡色库蚊对敌百虫抗性的研究, 《昆虫学报》23(4) 1980: 350—357
- [5] 赵善欢: 昆虫毒理学的发展方向, 《中国农业科学》(6) 1962: 2—8
- [6] 赤井弘: 昆虫超微形态学, 学会出版セリタ一, 1976年
- [7] Asperen, K. Van 1962. Studies of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol. 8: 401—416
- [8] Bessey, O. A. et al., 1946. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J. Biol. Chem. 164: 321—329
- [9] Keeley, L. L. 1978. Endocrine regulation of fat body development and function. Ann. Rev. Entomol. 23: 329—352
- [10] Kilby, B. A. 1963. The biochemistry of the insect fat body. Adv. Insect

- physiol. 1:112—174
- (11) Price, G.M. 1969. Protein synthesis and nucleic acid metabolism in the fat body of the larvae of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. J. Insect Physiol. 15: 931—944
- (12) Scott, J.G. and G.P. Georgioui, 1986. Malathion-specific resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2: 29—32
- (13) Terriere, L.C. 1984. Induction of detoxication enzyme in insects. Ann. Rev. Entomol. 29: 71—88
- (14) Wongkobrat, A. et al., 1976. Larval *Manduca sexta* hemolymph carboxylesterase activity during chronic exposure to insecticide containing diets. J. Economic Entomol. 69: 237—240
- (15) Yasutomi, K. 1983. Role of detoxication esterases in insecticide resistance. In, "Pest resistance to pesticides", by Georgioui, G.P. ed., Plenum Press, N.Y. 249—263

EFFECTS OF TRICHLORFON ON THE ESTERASES AND FAT BODY  
ULTRASTRUCTURES OF THE LYCHEE STINK BUG,  
*TESSARATOMA PAPILLOSA* DRURY

Chen Wenkui     Chiu Shin-Foon  
(Department of Plant Protection)

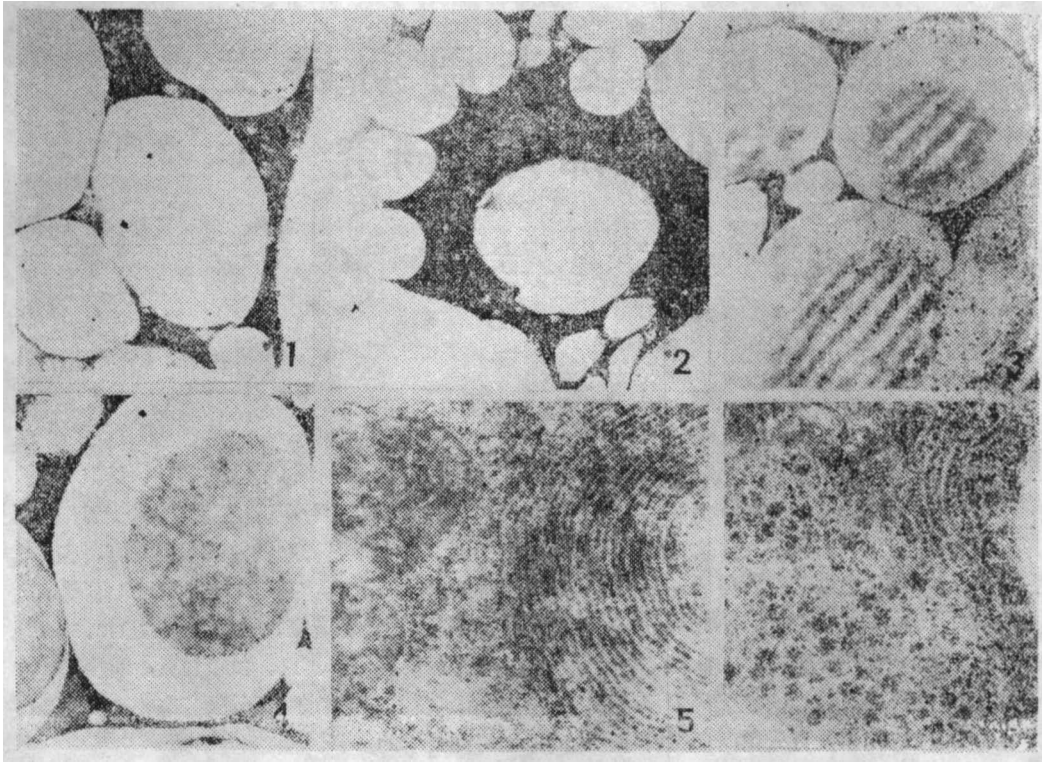
ABSTRACT

In South China the Lychee stink bug is a very serious pest of the Lychee tree. It passes only one generation each year. It was found that there is a great variation in the tolerance (natural resistance) of the adults to trichlorfon in the spring and winter. In order to study the mechanism of tolerance, experiments were conducted to monitoring the enzyme activity and observation were made on the ultrastructures of the fat bodies and the effects of trichlorfon in various periods of 1985-1986 in Guangzhou. Results of studies showed that the enzyme activity of the alkaline phosphatase was high in the newly-emerged adults, the activity being 1.83  $\mu\text{mol/min}$ , during the overwintering period, the activity was the lowest, being 0.30  $\mu\text{mol/min}$  and during the reproductive period being 0.67  $\mu\text{mol/min}$ . After treatment with trichlorfon by topical application, the activity was increased, indicating the effect of induction. The activity of acid phosphatase was found to be different from that of the alkline

phosphatase. From the newly-emerged adults passing through the winter to the reproductive period in the spring, the enzyme activity decreased gradually from  $5.7\mu\text{mol}/\text{min}$  to  $5.47\mu\text{mol}/\text{min}$ ,  $4.8\mu\text{mol}/\text{min}$ , respectively. There was a marked decrease after treatment with trichlorfon, particularly in October and December. The carboxylesterase was found to be similar to that of alkaline phosphatase, for the newly-emerged adults,  $1.48\text{mmol}/\text{min}$ , overwintering,  $0.42\text{mmol}/\text{min}$  and reproductive period,  $0.72\text{mmol}/\text{min}$ . Trichlorfon also induced the activity of the enzyme. Upon examination with electronic microscope, many vacuoles were observed in the fat bodies of the newly-emerged adult, however, during the overwintering period granules of glycogen were found, and during the reproductive period linear, rough endoplasmic reticulum network was found to be dominant. No significant change in the ultrastructure of the fat bodies was found in the adults treated with trichlorfon, indicating that the target site of action might not be in the fat bodies.

Spraying of trichlorfon twice a year in the spring and early summer when the tolerance of the insect to insecticides is the lowest has been used as a very effective method of controlling the bug for over 20 years in South China and up to the present no resistance to trichlorfon has ever been observed. This serves as a good example that sophisticated application of insecticides may avoid or delay occurrence of pesticide resistance in insect populations in the field and deserves further investigations.

Key words, *Tessaratoma pepillosa*, trichlorfon; fat body; alkaline phosphatase; acid phosphatase; carboxylesterase; tolerance (natural resistance)



- 图版 1.新羽化的荔枝蜡雌成虫脂肪体超微结构，示大量空泡。×8350  
 2.新羽化的荔枝蜡雌成虫经敌百虫处理后24小时脂肪体超微结构。×6450  
 3.越冬期的荔枝蜡雌成虫脂肪体超微结构，示大量脂肪滴。×6450  
 4.越冬期的荔枝蜡雌成虫经敌百虫处理后24小时，脂肪体无明显变化。×6450  
 5.生殖期的荔枝蜡雌成虫脂肪体超微结构，示大量线粒体和粗面内质网。×30000  
 6.生殖期的荔枝蜡雌成虫经敌百虫处理后24小时，脂肪体无明显变化。×30000