

荔枝中乙酰胆碱酯酶活性与 自然抗药性的关系*

陈文奎 赵善欢
(昆虫毒理研究室)

摘要 本文研究了荔枝头部乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性的季节性变化与自然抗药性的关系, 以及敌百虫对 AChE 的影响, 同时运用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法, 探讨了荔枝酯酶同功酶的变动情况。结果表明: 荔枝正常成虫头部 AChE 活性在新羽化成虫中最高, 比活力达 $3.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白质, 越冬期最低, 仅 $1.17 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白质, 到生殖期又上升为 $2.67 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白质。经敌百虫处理后, 在新羽化成虫期和生殖期 AChE 活性有明显被抑制现象, 其比活力分别为 $2.21 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白质和 $2.04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白质, 而在越冬期 AChE 活性几乎不受敌百虫影响, 为 $1.24 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白质。同功酶谱也显示 AChE 在不同季节中无明显变化。

关键词 荔枝; 自然抗药性; 敌百虫; 乙酰胆碱酯酶; 同功酶

荔枝 (*Tessaratoma papillosa* Drury) 是荔枝、龙眼的重要害虫之一, 自60年代中期推广应用敌百虫防治荔枝的为害以来, 已有20多年历史, 取得了很好的效果。已知荔枝对敌百虫存在着自然抗药性现象, 但对其自然抗药性机理还不十分清楚。作为有机磷酸酯类杀虫剂的作用靶标, 目前大多数昆虫毒理学家认为, 主要是乙酰胆碱酯酶 (AChE)^[6,10,11,13,16,21], 但也有部分学者对此持有不同看法^[14]。尽管如此, AChE 在神经传递过程中无疑是重要的, 对许多神经毒剂来说也同样重要。在害虫抗性机理研究中, 已有报道棉红蜘蛛 (*Tetranychus urticae*) 抗有机磷品系中 AChE 已发生变异^[17]。对家蝇 (*M. musca domestica*) 中抗性与 AChE 改变的关系研究较多, 也最详细^[3,7,18~20,22], 研究结果表明, 在抗性家蝇品系中, AChE 对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂敏感性降低, 是由于 AChE 出现了突变型。此外, Ayad 等^[8]、Brogdon 等^[9]研究了淡色库蚊 (*Anopheles albimanus*), 孙耘芹等^[2]研究了棉蚜 (*Aphis gossypii*) 的 AChE 对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂敏感性改变与抗性有密切关系。

这些研究都表明, AChE 对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂敏感性改变, 是许多昆虫产生抗药性的重要原因之一。但在具有自然抗药性现象的昆虫中, 是否也存在这种机理? 荔枝对敌百虫的自然抗药性与体内 AChE 活性的变化是否有关系? 这些问题尚未有公开报道。本研究重点对荔枝不同季节中头部 AChE 的活性变化以及对敌百虫敏感性反应的情况进行探讨, 为更好地解释荔枝自然抗药性机理和制定实际防治策略提供依据。

* 本研究为国家教委高等院校博士点基金资助项目。
1990-04-13 收稿

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

在不同季节中从果园分别采回荔枝成虫,置于养虫笼内,挂在荔枝树上饲养2~3 d,然后取出供试验用。另外,为便于分析、测定,特将成虫期分为3个时期,即新羽化成虫期(6~10月),越冬成虫期(11~1月),生殖成虫期(第2年2~5月)。

1.2 AChE 活性测定方法

根据 Ellman 等^[12]方法进行。抑制剂为 1×10^{-8} mol/L 毒扁豆碱。标准曲线用谷胱甘肽(GSH)制作。用 Lowry 等^[5]方法测定样品蛋白质含量。

1.3 酶源制备

取不同时期的荔枝雌成虫60头,分成两组,一组用0.1%敌百虫点滴处理,另一组用丙酮点滴为对照,每处理重复3次。24 h后,解剖取出供试昆虫头部,加入1.5 ml, pH7.4, 0.2 mol/L 磷酸缓冲液,在低温下匀浆,以12 000 r/min,离心10 min,取上清液供测定用。在国产721型分光光度计上测定光密度值(OD值),波长为412 nm。

1.4 酯酶同功酶电泳

参考陈巧云等^[5]、北京大学^[12]方法略加改变。

凝胶制备,浓缩胶3%,分离胶8%,采用垂直板状电泳槽制成聚丙烯酰胺凝胶,为不连续梯度的电泳缓冲液系统。

电泳条件,电极缓冲液为pH7.8 Tris-甘氨酸缓冲液,采用VIW-2三恒电泳仪,电压650—1 200 V,电流30~50 mA,点样11个槽,在4°C冰箱内电泳1 h左右。

AChE 电泳谱带的确定,采用两种方法,一是用毒扁豆碱、敌百虫等作抑制剂;二是根据北京大学^[12]方法进行。电泳谱带用岛津CS-930型薄层扫描仪扫描,波长500 nm。

2 结果分析

2.1 在不同季节中荔枝头部 AChE 活性的变化

荔枝正常雌成虫头部 AChE 活性,随着季节的变化而有较大的变异(见表1、2),从新羽化的成虫开始直至交尾产卵时的成虫,雌虫头部 AChE 的活性变化趋势,呈“u”形(见图1)。即在新羽化雌虫最高为 $0.65 \mu\text{mol}/\text{min}$ 比活力为 $3.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白质(8月),到越冬时降到最低。

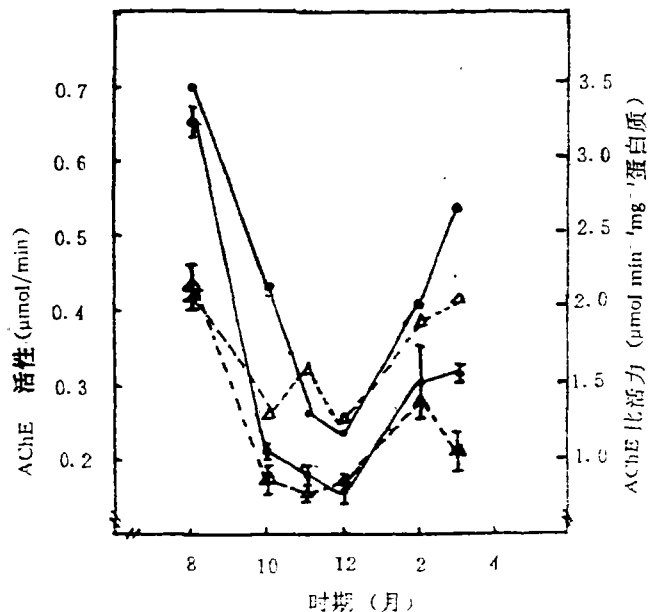


图1.荔枝雌成虫头部 AChE 活性变化及敌百虫的影响
(●) 对照 AChE 活性; (■) 敌百虫处理后 AChE 活性
(▲) 对照 AChE 比活力; (◆) 敌百虫处理后 AChE 比活力

仅 $0.16 \mu\text{mol}/\text{min}$ ，比活力为 $1.17 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ 蛋白质（12月），到翌年开春后，进入生殖期时，酶活性又逐渐上升到 $0.36 \mu\text{mol}/\text{min}$ ，比活力也升高为 $2.67 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ 蛋白质。从以上这些结果可说明，正常荔枝雌虫头部 AChE 活性随季节变化而变化是很明显的，在雌虫的生长发育中，AChE 的活性总是处于动态变化之中，与对杀虫剂敌百虫的敏感性变化存在密切关系。

表1 荔枝成虫头部乙酰胆碱脂酶活性变化情况

处 理	酶 源	酶活性* ($\mu\text{mol}/\text{min}$)					
		8月	10月	11月	12月	2月	3月
对 照	头 部	0.65±	0.21±	0.18±	0.16±	0.30±	0.36±
		0.02	0.01	0.01	0.02	0.05	0.01
0.1% 敌百虫	头 部	0.43±	0.17±	0.17±	0.18±	0.28±	0.21±
		0.03	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02

* 酶活性系以谷胱甘肽所提供的-SH显色反应计算每分钟克分子数，±表示平均标准差（六次测定值）。

表2 荔枝成虫头部乙酰胆碱酶比活力变化情况

处 理	酶 源	酶比活力* ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{P}$)					
		8月	10月	11月	12月	2月	3月
对 照	头 部	3.50	2.17	1.58	1.17	2.01	2.67
0.1% 敌百虫	头 部	2.21	1.28	1.60	1.24	1.93	2.04

* 酶比活力系每毫克蛋白内 AChE 活性比值。

2.2 在不同季节中敌百虫对荔枝雌虫头部 AChE 活性的影响

用 0.1% 敌百虫点滴处理荔枝不同发育时期的雌虫后，再测定其头部 AChE 活性的变化，结果表明（见表1、2），在新羽化和生殖期雌虫中，敌百虫能抑制体内 AChE 的活性，经敌百虫处理后，这两个时期 AChE 的分别为 $0.443 \mu\text{mol}/\text{min}$ 和 $0.27 \mu\text{mol}/\text{min}$ ，与正常未处理雌虫比较，AChE 活性分别被抑制 33% 和 41.7%。但在越冬期，用敌百虫处理后的荔枝雌虫，头部 AChE 活性几乎没有被抑制，与正常雌虫的 AChE 活性相近，这可能是由于在越冬期荔枝对外界刺激反应迟钝，活动减少，新陈代谢水平降低，AChE 活性也随之降低，对有机磷杀虫剂表现出敏感性下降，这也可能是荔枝对敌百虫等杀虫剂在冬季自然抗药性增强的原因之一。

2.3 不同季节中荔枝雌虫体内酯酶同功酶的变动情况

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法，对不同季节中荔枝酯酶同功酶的研究结果见图2、3。从这些电泳图谱可看出，在不同季节中，荔枝雌虫头部乙酰胆碱酯酶谱带（峰3）没有大的变化，主要是峰的高低不同（染色的深浅不同），同时比较不同季节之间荔枝雌虫其他酯酶同功酶的电泳谱带变化，结合生物化学方法测定的结果，进一步证实荔枝雌虫头部酯酶活性

(包括乙酰胆碱酯酶活性) 在冬季是最低的。

此外, 在不同季节, 经0.1%敌百虫处理荔枝成虫后, 取出脂肪体组织所进行的电泳结果(见图3)表明, 尽管敌百虫的作用靶标是神经系统中的乙酰胆碱酯酶, 然而它对脂肪体内其他酯酶也具有不同的抑制或诱导作用。如在新羽化成虫和生殖期成虫中(见图3A~D), 谱带11峰, 在敌百虫处理后都明显增高了, 这说明敌百虫对这一酯酶具有诱导作用, 对第10和12峰则有抑制作用。在越冬期, 荔枝脂肪体酯酶, 从图3E、F中可以看出, 电泳图谱一般均比其他两个时期低, 说明越冬期荔枝脂肪体酯酶活性也和头部酯酶活性相似, 处于最低状态。这些也进一步支持了生化方法所测定过的荔枝体内几种酯酶活性的变化情况^[4]。经敌百虫处理后, 越冬期荔枝雌虫脂肪体组织内酯酶同工酶电泳谱带峰高大多数高于对照, 并且谱带数量也多于对照, 说明敌百虫对荔枝雌虫越冬期间的脂肪体酯酶的诱导作用较明显。

3 讨论

昆虫体内AChE的改变可以使这种昆虫对杀虫剂的敏感性发生变异, 造成杀虫效果降低甚至无效, 这种情况已在不少抗性昆虫中得到了证实^[2,3,6,9,18]。

在荔枝中, 虽然AChE活性随季节的变化而不同, 对敌百虫的敏感性差异也很大, 在冬季荔枝AChE对敌百虫表现出不敏感, 似乎与“获得性抗性”昆虫中的情况很相似, 但综合其他生理生化方面研究的结果, 如不同季节中荔枝酯酶活性的变化情况, 也是在冬季活性降低^[4], 根据这些结果, 我们认为尽管在越冬期荔枝体内AChE对敌百虫不敏感是荔枝自然抗药性的原因之一, 但这种现象与“获得性抗性”昆虫中的情况有本质的区别。首先, 在荔枝的自然抗药性中, 它可对不同作用机制的杀虫剂表现出自然抗药性, 包括有机氯、有机磷、氨基甲酸酯或其他类型的杀虫剂, 而并不是单一的抗一、二种药剂。另外, 我们知道, 不同的等位基因形成不同的酶, 它们的结构和性质都

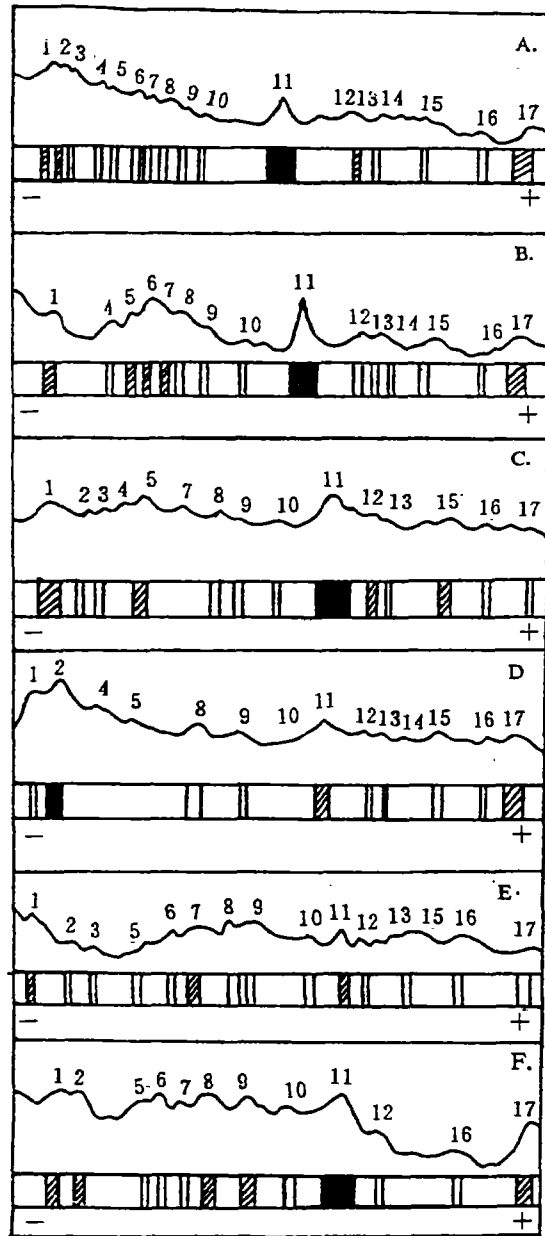


图2 荔枝头部酯酶同工酶电泳图谱

A、C、E分别为新羽化期、生殖期和越冬期对照组;

B、D、F, 分别为新羽化期、

生殖期和越冬期敌百虫处理组

可以不同.在抗性家蝇、牛蝇等昆虫中,已证实存在不同的等位基因.而在荔枝中,经电泳方法研究同功酶的结果表明,在不同时期荔枝头部 AChE 同功酶谱带并没有出现大的变化,仅在量上有差异,说明其等位基因并未发生变化.所以说荔枝对敌百虫的自然抗药性机理与家蝇等获得抗性昆虫的机理有所不同,很可能还存在着其他因素.根据我们对荔枝多功能氧化酶(待发表资料)、表皮穿透性(待发表资料)、酯酶等的研究表明,荔枝的自然抗药性是由于在长期进化过程中,形成了遗传性稳定的“生殖滞育”(reproductive diapause),导致在“生殖滞育”期整体新陈代谢水平降低,抗逆力增强,包括对杀虫剂的抵抗力增强.

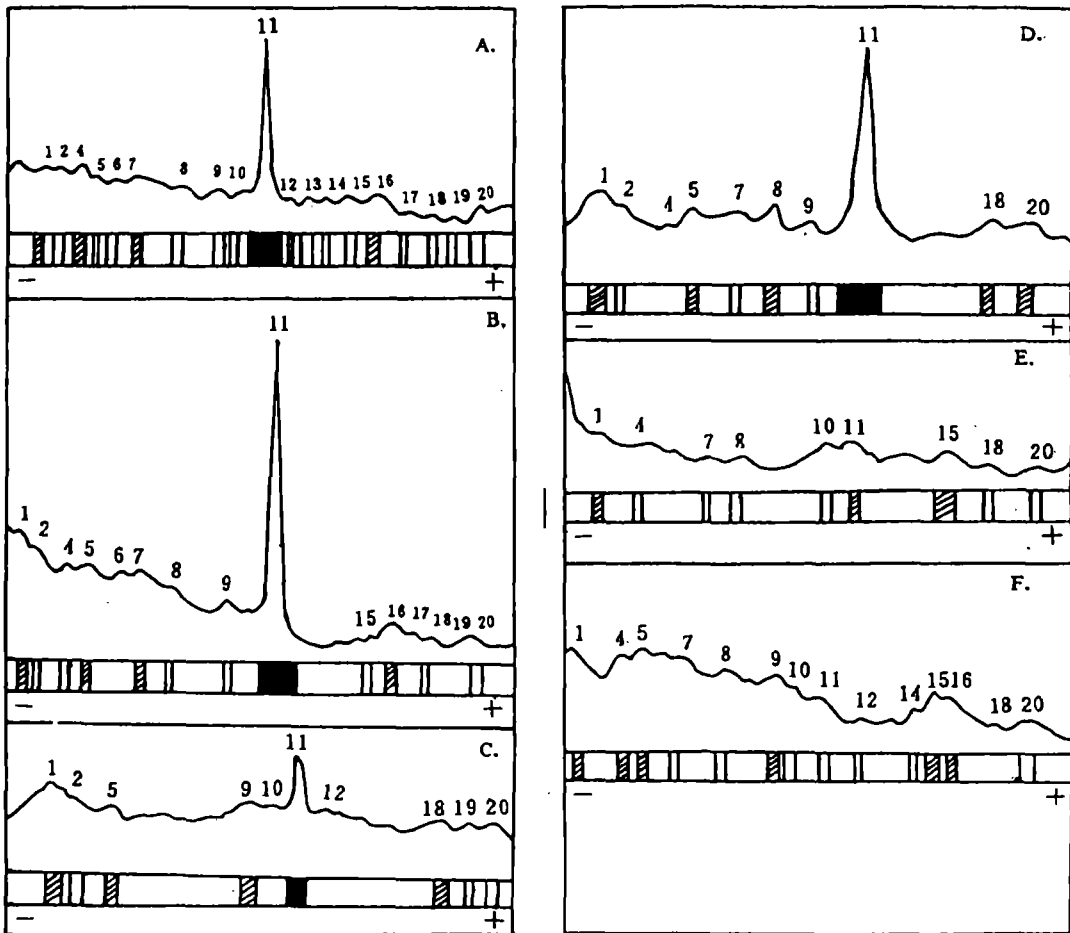


图3 荔枝脂肪体酯酶同功酶电泳图谱

A. C. E 分别为新羽化期、生殖期和越冬期对照组

B. D. F. 分别为新羽化期、生殖期和越冬期敌百虫处理组

参 考 文 献

- 1 北京大学生物系. 遗传学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1983. 272
- 2 孙耘芹等. 棉蚜对有机磷杀虫剂抗性的生理机理. 昆虫学报, 1987, 30(1): 13~20
- 3 李月明等. 乙酰胆碱酯酶敏感性的变化与家蝇抗药性的关系. 昆虫学报, 1987, 30(3): 239~245
- 4 陈文奎, 赵善欢. 敌百虫对荔枝脂肪体酯酶及其超微结构的影响. 华南农业大学报, 1988, 9(1): 30~40
- 5 陈巧云等. 淡色库蚊对敌百虫抗性机制的研究. 昆虫学报, 1980, 23(4): 350~357
- 6 张宗炳. 杀虫药剂的分子毒理学. 北京: 农业出版社, 1987, 382
- 7 袁家硅等. 家蝇中乙酰胆碱酯酶、羧酸酯酶和多功能氧化酶活性与抗药性的关系. 昆虫学报, 1987, 30(2): 126~132
- 8 Ayad A, et al. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. J Econ Entomol, 1975, 68:295~301
- 9 Brogdon W G, et al. Microplate assay analysis of the distribution of organophosphate and carbamate resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. Biol Sanit Panam, 1989, 106(2): 139~152
- 10 Coats J R. Insecticide Mode of Action. New York: Academic Press, 1982. 470
- 11 Corbett J R, et al. The Biochemical Mode of Action of Pesticides. London: Academic Press. 1984. 382
- 12 Ellman G L, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharm, 1961, 7: 88~95
- 13 Fest C K, et al. The Chemistry of Organophosphorus Pesticides. Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Press, 1982. 360
- 14 Gerolt P. Insecticides, Their route of entry, mechanism of transport and mode of action. Biol Rev, 1983, 58: 233~253
- 15 Lowry D H, et al. Protein measurement with Folin Phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193: 265~270
- 16 Matsumura F. Toxicology of Insecticides. New York: Plenum Press, 1986. 598
- 17 Smitsaert H R. Acetylcholinesterases of organophosphate - susceptible and - resistance spider mites. J Ag Food Chem, 1970, 18: 66~71
- 18 Tripathi R K, et al. Effect of organophosphates *in vivo* upon acetylcholinesterase isozymes from housefly head and thorax. Pestic Biochem Physiol, 1973, 2: 418~424
- 19 Ugak M, et al. Insensitive acetylcholinesterase in organophosphorus insecticide - resistant houseflies, *Musca domestica* L. collected from various localities in Japan. Appl Entom Zool, 1981, 16: 506~511
- 20 Vess G. Cholinesterase autoanalysis: A rapid method for biochemical studies on susceptible and resistant insects. J Econ Entom, 1980, 73: 189~195
- 21 Wilkinson C F. Insecticide Biochemistry and Physiology. New York: Plenum Press, 1976. 768
- 22 Yeoh C L, et al. Studies on the mechanism of organophosphate resistance in oriental houseflies, *Musca domestica vicina* Macquart (Diptera: Muscidae). Appl Entom Zool, 1981, 16: 247~251

RELATIONSHIP BETWEEN THE ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE AND
THE TOLERANCE TO INSECTICIDE IN THE LYCHEE STINK BUG,
Tessaratoma papillosa

Chen Wenkui Chiu Shin —Foon
(Laboratory of Insect Toxicology)

Abstract The acetylcholinesterase (AChE) activity of the Lychee stink bug, *Tessaratoma papillosa* Drury was determined during different seasons. The activity of AChE was 3.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein during the newly emerged period, 1.17 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein during the overwintering period and 2.67 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein during the reproductive period, respectively. Results of detailed laboratory studies showed that the tolerance to trichlorfon is caused by the insensitivity of the AChE to the insecticide. Dynamic changes of AChE and esterase isozymes were studied by means of polyacrylamide gel electrophoresis. Scanning of electrophoresis zymograms showed that no changes took place in the AChE zymograms.

Key words *Tessaratoma papillosa*, Insecticide tolerance, Trichlorfon, Acetylcholinesterase, Isozymes