

溴氰菊酯对马尾松毛虫幼虫血淋巴 酯酶活性的影响效应*

朱鹏飞** 王荫长 尤子平

(南京农业大学植保系)

摘要 在马尾松毛虫越冬后活动期和第一代五龄幼虫血淋巴中, 酯酶活性日变化动态均呈“∞”形曲线, 与血糖、血脂含量的日变化之间分别呈正相关和负相关。用溴氰菊酯处理以后, 敏感品系中酯酶活性在击倒期下降, 至兴奋期回升, 痉挛期又大幅度下降, 恢复或濒死时又进一步回升, 低剂量(LD₅)处理的变幅很大, 高剂量(LD₉₅)的变幅较小。耐药品系的酯酶活性在击倒期明显下降, 以后逐步回升, 变幅小于敏感品系。低剂量处理后, 敏感品系酯酶与血脂之间出现正相关的变化, 而耐药品系的酯酶不仅与血脂之间出现正相关, 而且与血糖之间出现负相关, 说明两品系中毒以后的代谢及其调控机制是不同的。另外, 两品系在低剂量处理后恢复期及高剂量处理后濒死期的酯酶活性相差不大, 说明死亡与否和酯酶活性无关。

关键词 马尾松毛虫; 酯酶; 溴氰菊酯

酯酶分布于昆虫的很多重要组织器官中, 并在昆虫生长、发育过程中对酯类和杀虫剂的代谢起着重要的作用。由于酯酶种类的多样性及各种酯酶本身结构和功能的复杂性, 近年来酯酶对杀虫剂的代谢及其生理生化机制逐步引起了人们的兴趣^[1]。在我国松毛虫严重危害地区, 溴氰菊酯使用后出现了抗性问题的, 了解溴氰菊酯处理以后对松毛虫酯酶活性的影响, 有助于阐明溴氰菊酯的毒杀机制和害虫耐药性机制。本文以不同剂量溴氰菊酯处理马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus* Walker)五龄幼虫, 测定血淋巴酯酶活性变化情况, 并结合血淋巴中糖、酯的含量变化, 对血淋巴酯酶的作用及糖酯代谢进行了分析, 以揭示酯酶与血糖、血脂代谢的相关性, 并为探求松毛虫耐药性水平以及用酯酶活性作为生理生化指标提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫及饲养

马尾松毛虫敏感品系采自浙江省永康县; 耐药品系采自浙江省衢县。溴氰菊酯对两品系的LD₅₀分别为 1.26×10^{-4} 和 $1.29 \times 10^{-3} \mu\text{g/g}$ 。试虫饲养在27℃恒温箱内, 照明用4支20w日光灯, 每日光照10h, 用新鲜马尾松针叶作饲料。测定时取生长一致的五龄幼虫。

本文于1990年6月26日收到。

*国家自然科学基金资助项目。

**现在地址: 江苏扬州江苏农学院植保系。

1.2 供试药剂及处理方法

溴氰菊酯系法国罗素·尤克福公司的原粉, 纯度97.5%。低剂量处理敏感品系为 $2.5 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{头}$, 耐药品系为 $2.5 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{头}$ (死亡率在5%左右); 高剂量处理敏感品系为 $3.9 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{头}$, 耐药品系为 $2.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{头}$ (死亡率95%左右)。用毛细管点滴器处理试虫, 毛细管的容积为 $1 \mu\text{l}$, 点滴部位为前胸背部。用丙酮稀释原粉, 每次均用丙酮处理作对照, 同时测定处理组与对照组的酯酶活性, 血糖和血脂的含量, 算出处理后的变化幅度。

1.3 血淋巴样品制备

用昆虫针刺破供试昆虫的腹足, 取出血淋巴置于 1 ml 的塑料离心管中, 贮入 -30°C 的低温冰箱中待测。取样时间在每日7~17时。药剂处理后先在15 min与30 min时取两次血样, 以后每隔1 h取样一次。

1.4 酯酶活性、血糖与血脂的测定

酯酶活性测定: 准确吸取血淋巴 $100 \mu\text{l}$, 加 0.04 M 磷酸缓冲液 ($\text{pH} 7.0$) $900 \mu\text{l}$ 混匀, 于 $4000 \text{ rpm}/\text{min}$ 离心 15 min , 取 0.5 ml 上清液用上述缓冲液稀释至 5 ml 备用, 整个过程均在 4°C 下操作。取 $3 \times 10^{-2} \text{ M}$ 的 α -醋酸萘酯母液用 0.04 M 磷酸缓冲液稀释100倍, 取 5 ml 稀释液加 $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ 的毒扁豆碱丙酮液 $3 \mu\text{l}$ 混匀。移入 25°C 温浴中保持 5 min , 加上述稀释的上清液 1 ml , 温浴 30 min , 立刻加入 1 ml 显色液 (1% 固蓝B与 5% 十二烷基硫酸钠, 在用前以 $2:5$ 混合而成), 温浴 30 min , 用分光光度计在 600 nm 下比色。另用甲萘酚配成一系列浓度, 加显色液 1 ml 显色, 制成标准曲线, 求得回归方程, 再由该方程求得酯酶活性。血糖含量测定采用蒽酮法测总糖量; 酯以甘油酯为代表, 采用分溶抽提——乙酰丙酮显色法, 测出血淋巴中甘油酯总量。比色测定用岛津紫外分光光度计^[2]。

2 结果分析

2.1 幼虫血淋巴酯酶活性的日变化动态

采用松毛虫敏感品系的越冬后活动期及第一代五龄幼虫, 测定血淋巴酯酶活性, 从上午7时至下午4时的变化见图1。从图中可以看出, 两代幼虫的酯酶活性均在上午8时左右出现一个高峰, 随后逐渐下降, 至12时开始缓慢回升, 整条曲线呈“∞”形。酯酶活性的日平均水平是越冬后活动期幼虫高于第一代幼虫, 分别为 41.2 和 $36.5 \text{ mM}/\text{min}$ 。

2.2 溴氰菊酯对血淋巴酯酶活性的影响

敏感品系的幼虫酯酶活性(图2 A)在高剂量处理后 8 h 内仅在 $1 \sim 2 \text{ h}$ 出现下降, 其它时间均高于对照; 低剂量处理则仅在处理后 30 min 左右有微弱的上升, 其后活性都比较低, 至 8 h 后才回升, 并高于对照水平。耐药品系(图2 B)用高剂量处理后仅于 5 h 左右出现回升; 而低剂量处理后则于 $2 \sim 4 \text{ h}$ 活性高于对照。可见同样用致死剂量处理, 不同品系血淋巴酯酶活性变化动态是不同的, 敏感品系受高剂量处理后活性水平

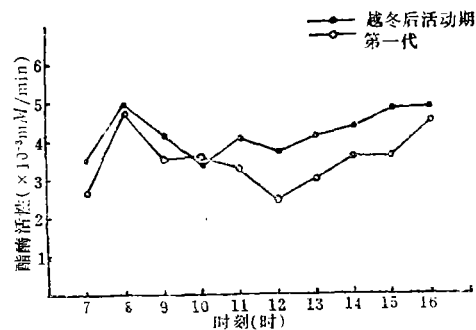


图1 血淋巴酯酶活性日变化动态

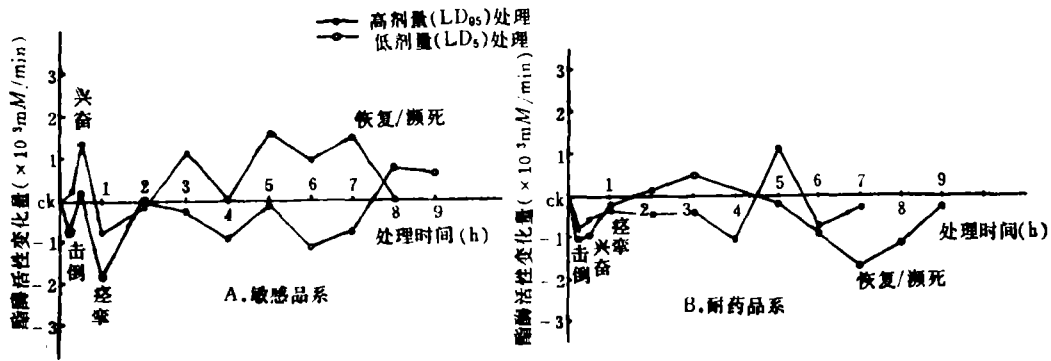


图2 溴氰菊酯处理后血淋巴酯酶活性变化动态

提高，而低剂量处理后在相应的时间内活性降低；耐药品系用高、低剂量处理后均出现酯酶活性下降的趋势，但低剂量处理的试虫酯酶活性回升较明显。

2.3 溴氰菊酯的中毒症状及与酯酶活性的关系

两个品系试虫用溴氰菊酯处理后，表现的中毒症状是一致的，大致分四个阶段：处理后5 min左右出现短期兴奋，30 min内被击倒；随后出现极度兴奋；至1 h左右出现痉挛；低剂量处理时中毒症状逐渐消失，至8 h左右症状已基本消失而恢复正常，而高剂量处理则至6 h左右即濒临死亡。在出现各种症状时，血淋巴中酯酶活性、糖和酯的含量变化情况见表1。

表1 幼虫中毒症状与血淋巴中酯酶活性、血糖和血脂含量变化关系

供试虫样	项目	低剂量处理				高剂量处理			
		击倒	兴奋	痉挛	恢复	击倒	兴奋	痉挛	濒死
敏感品系	酯酶活性(mM/min)	-22.7	+4.3	-56.4	+19.3	+4.8	+39.6	-25.2	+16.2
	血脂含量(mg/100 ml)	-44.4	+84.7	-38.6	+1.0	-21.0	-16.5	-25.0	-21.6
	血糖含量(mg/ml)	+4.0	-2.2	+1.6	-3.2	+28.4	+12.5	-34.3	+4.7
耐药品系	酯酶活性(mM/min)	-33.2	-27.0	-6.5	-1.9	-23.8	-15.5	-8.9	-2.5
	血脂含量(mg/100 ml)	-29.8	-60.0	-28.3	-137.5	-24.0	+2.5	-31.0	-156.0
	血糖含量(mg/ml)	-28.3	-16.6	-30.5	+0.1	-5.8	-4.4	+0.4	+0.1

注：表中数值为相对于对照的变化量。

敏感品系幼虫在溴氰菊酯处理后，无论剂量高低，在击倒时酯酶活性较低，至兴奋期出现回升，痉挛期大幅度下降，在恢复期或濒死期再度回升。高剂量处理的波动幅度小，在击倒期活性水平略高于对照；低剂量处理的波动幅度大，在击倒期下降明显。耐药品系用两种剂量处理后，酯酶活性在击倒期都明显下降，以后逐渐回升，至恢复期或濒死期恢复到接近正常水平。两品系的酯酶在痉挛期后，两种剂量处理的活性水平相差不大，但症状表现不一致，即低剂量处理的试虫趋于正常，高剂量处理的接近濒死，说明是否死亡与酯酶活性无关。

2.4 血淋巴中酯酶活性与糖、酯动态变化的关系

正常情况下，酯酶活性与血糖、血脂含量之间分别呈正相关和负相关，血糖与血脂含量之间为负相关(见表2)。低剂量溴氰菊酯处理后，两品系的酯酶与酯之间均出现正相关，但酯酶与糖之间则仅在耐药品系出现负相关。高剂量溴氰菊酯处理后，耐药品系中三者之间的

相关性仍与正常的相一致, 但敏感品系中血糖与血脂之间的显著负相关遭到破坏。由此可见, 敏感程度不同的品系在受药后血糖、血脂的代谢调节作用是不同的, 耐药品系对药剂的响应与协调作用明显比敏感品系有效。

表 2 血淋巴中酯酶活性、血糖和血脂含量动态变化的相关性分析

供试虫样 处 理	血糖-血脂		酯酶-血脂		酯酶-血糖	
	相关系数	样本数	相关系数	样本数	相关系数	样本数
对 照	-0.780 2 **	7	-0.804 5 **	7	0.744 8 **	9
敏感品系 高剂量	-0.291 0	9	-0.842 0 ***	9	0.621 7 *	8
低剂量	-0.592 4 *	10	0.585 9 *	10	0.624 9 *	9
耐药品系 高剂量	-0.672 5 *	7	-0.782 7 **	8	0.864 2 *	5
低剂量	-0.629 8 **	12	-0.810 6 ***	10	-0.722 9 *	7

注: *** $|r| > r_{0.01}$, ** $|r| > r_{0.05}$, * $|r| > r_{0.10}$ 。

3 讨 论

(1) 在室内恒定条件下, 马尾松毛虫幼虫血淋巴酯酶活性的日变化动态为“ \cup ”形曲线, 世代间的差异主要表现在活性水平的高低上, 这说明血淋巴酯酶活性变化存在节律性, 从作者研究结果来看, 这种节律性主要受光周期和取食习性等影响, 非节律性的变化则与试虫的行为活动及食物营养等有关。从糖、酯、酯酶三者关系来看, 在正常的生理代谢和能量供应中, 酯酶活性是在代谢过程中降解多种酯类, 降低血淋巴中血脂含量, 同时血脂含量的变化影响到血糖的代谢, 因此, 酯酶的节律性和特定时期的变化, 有利于保证代谢过程的节律性和相对稳定性。在中毒时, 昆虫血糖、血脂的代谢通过神经内分泌系统产生多肽类神经激素, 如高血糖激素和酯动激素等进行调节^[3~6]。酯酶与血糖、血脂之间的相关性表明, 酯酶活性变化受到神经激素的调控, 而神经激素又直接或间接地受神经系统的控制^[9]。

(2) 试验结果表明, 溴氰菊酯不仅直接毒害昆虫神经系统, 引起昆虫中毒, 干扰血糖、血脂的正常代谢, 还干扰酯酶的正常调节功能。因此, 酯酶的变化动态也是药剂毒效的反映。昆虫为了抵御杀虫剂的作用, 必然会进行种种保护性的自身协调反应, 以减少中毒死亡。在抵偿杀虫剂不良反应的协调适应中, 也会引起昆虫耐药能力的提高。在研究糖、酯代谢特征的同时, 了解酯酶及其在杀虫剂作用下的变化规律, 特别是低致死剂量下的规律性, 有助于深入理解害虫抗药性产生与发展的机制, 探索治理抗性的有效措施。

(3) 溴氰菊酯处理后, 在出现各种症状时, 测定酯酶活性变化的结果表明, 两个品系在溴氰菊酯处理后的动态变化存在明显的规律性, 而且, 在两个品系之间存在异质性。可见酯酶活性的动态变化能反映昆虫耐药水平的差异, 同时反映了以酯酶作为抗药性生理生化指标的可能性。掌握已发生抗药性品系的酯酶活性动态变化的规律性, 则有助于减少抗药性监测和预测的误差。

参 考 文 献

- [1] Mittler, T. E. et al., 1983, Metabolic aspects of lipid nutrition in insects, Westview Press,

Colorado.

- [2] 朱鹏飞等, 1990, 马尾松毛虫幼虫血糖和血脂的变化动态及杀虫剂的影响效应, 林业科学研究, 3(1): 15~21.
- [3] Singh, G. J. P., 1986, Hemolymph carbohydrate and lipid mobilization in *Locusta migratoria* in relation to the progress of poisoning following bioresmethrin treatment, *Pestic. Biochem. Physiol.* 25: 264~269.
- [4] Kumar, K. et al. 1984, Sublethal effects of insecticides on the diamondback moth *Plutella xylostella*, *Pesticide Science*, 15: 344~352.
- [5] Ziegler, R. et al., 1986, Regulation of lipid metabolism during flight in *Manduca sexta*, *J. Insect Physiol.* 32(10): 903~908.
- [6] Graham, J. Goldsworthy et al., 1989, Physiological and structural aspects of adipokinitic hormone function in locusts, *Pesticide Science*, 25(1): 85~95.

*Studies on the Dynamic Changes of Hemolymph
Esterases Activity of Dendrolimus punctatus
and the Effects of Deltamethrin*

Zhu Pengfei Wang Yinchang You Ziping

(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University)

Abstract Effects of deltamethrin on the hemolymph esterases activity (HEA) of the 5th instar larvae of *Dendrolimus punctatus* were studied. For the untreated larvae, both the summer larvae and the larvae after hibernation have a ∞ -form curve in the daily dynamic changes of HEA. The results also showed that the daily dynamic changes of HEA were negatively correlated with those of hemolymph lipid content(HLC), and positively with hemolymph carbohydrate content(HCC). The treatment of sublethal doses (LD_5) of deltamethrin could cause a positive correlation between HEA and HLC in both susceptible strain and tolerant strain, and a negative correlation between HEA and HCC in the tolerant strain. The activity of hemolymph esterases was found to be closely related to the poisoning syndrome of the deltamethrin. For the susceptible strain, the HEA depleted at the knocking down and convulsive stages, elevated at exiting and recovering or dying stages. Whereas in the tolerant strain, the HEA depleted at the knocking down stage only, and elevated gradually than after. In those two strains, the levels of HEA in the recovering and dying larvae were the same, this indicated that the hemolymph esterases play a less important part in the lethal effects caused by deltamethrin. Finally the importance of hemolymph esterases in the metabolism of hemolymph lipid and carbohydrate were discussed.

Key words *Dendrolimus punctatus*; esterases; deltamethrin