

马尾松毛虫和荔蝻体内多酚氧化酶的初步研究

Activities of Polyphenol Oxidase in *Dendrolimus punctatus* and *Tessaratomia popillosa*

陈尚文

杨振德

Chen Shangwen

Yang Zhende

(广西农业大学林学院 南宁市邕武路 16号 530001)

(Forestry Coll., Guangxi Agric. Univ., 16 Yongwu Road, Nanning, Guangxi, 530001)

摘要 为了寻找不污染环境的“生物合理途径”新型杀虫剂,研究了马尾松毛虫和荔蝻体内的多酚氧化酶。发现马尾松毛虫幼虫的多酚氧化酶活力与虫龄大小成正相关。多来宝 (etofenprox) 处理 100 min后, 5龄幼虫的多酚氧化酶为正常虫体的 3.6倍。荔蝻 3龄若虫经乙醇处理 10 min后, 多酚氧化酶活力为正常虫体的 2.7倍; 荔蝻 3龄若虫经菟丝子 (*Cuscuta japonica*) 和夹竹桃 (*Nerium indicum*) 的混合醇提液处理 60 min, 多酚氧化酶活力为正常虫体的 2.4倍。经乙醇单独处理荔蝻 3龄若虫后多酚氧化酶活力为正常虫体的 2.7倍。

关键词 马尾松毛虫 荔蝻 多酚氧化酶

Abstract The activities of polyphenol oxidase in the Massonpine caterpillar (*Dendrolimus punctatus* Walker) showed positive correlation with age increase in instars. After treating with etofenprox, the activity of polyphenol oxidase of fifth instar larvae was 3.6 times that of normal larvae. After treating with the extracts of *Cuscuta japonica* Choisy and *Nerium indicum* Mill respectively, the activity of polyphenol oxidase in the bugs (*Tessaratomia popillosa* Drury) was 2.4 times that of normal larvae.

Key words *Dendrolimus punctatus*, *Tessaratomia popillosa*, Polyphenol oxidase

马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker)和荔蝻 (*Tessaratomia popillosa* Drury) 为我国南方用材林和经济林的主要害虫,对生物学习性、种群动态、防治等均有许多研究^[1],但对生理生化研究得较少。多酚氧化酶是生物体内普遍存在的酶,除了参与酚类物质氧化外,还与苯丙基类化合物的代谢、类黄酮和生物碱的合成有关^[2]。在植物体内它与抗病性有密切关系^[3]。在昆虫体内也普遍存在。Dewitz早在 1905 年认为昆虫的多酚氧化酶与黑素形成相关联,在蛹化时最多,实际上引起变态。1978 年 Rockstein 指出多酚氧化酶与昆虫体内的酪氨酸代谢有关,而酪氨酸在昆虫脱皮时的鞣化过程中起重要作用^[2]。1992 年尚稚珍认为抑太保能导致玉米螟表皮酚氧化酶活性显著提高,幼虫变黑,但未指明与抗药性有关^[4]。1993 年李周直用氰戊菊酯处理马尾松毛虫幼虫发现多酚

氧化酶活力变化比较平稳,认为该酶与虫体的抗药性之间无明显的相关性^[5]。1993 年张宗炳指出,探索新杀虫药剂的一条最有希望的途径是生物合理途径,主要有 8 个方面,其中“原酪氨酸酶抑制剂”和“鞣化过程抑制剂”是列在第一、二位^[6],而多酚氧化酶与这两个方面都有关系。本文用新杀虫剂多来宝和植物制虫剂菟丝子、夹竹桃处理马尾松毛虫和荔蝻,研究它们体内多酚氧化酶的变化状况,目的在于探讨害虫抗药性与多酚氧化酶的关系,为合理用药及寻找新杀虫剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫种

马尾松毛虫 4~6 龄幼虫采自长期未使用过化学农药的广西南宁高峰林场,取卵粒用单管指形瓶饲养。经用湿地松针叶饲养后,选取各龄活动正常的个体进行测定。荔蝻 3 龄若虫采自长期未使用过化学农药的广西农业大学林学院校园的龙眼树上。

1.2 供试药剂与处理方法

10%多来宝 (etofenprox) 悬浮剂为一种模仿拟除虫菊酯结构的醚类杀虫剂, 化学成分为 2-(4-乙氧苯基)-2-甲基丙基-3-苯氧-甲苯氧醚, 一般将其归入拟除虫菊酯类中。将其以 1:1000 浓度稀释, 用滴管滴于培养皿滤纸上, 然后放入各龄马尾松毛虫幼虫, 每一处理 5 头。日本菟丝子 (*Cuscuta japonica* Choisy) 和夹竹桃 (*Nerium indicum* Mill) 均采自广西农业大学林学院校园。各称取 10 g 浸入 95% 乙醇 50 mL 中, 6 d 后各取 1 mL 混合加水, 将其以 1:15 稀释, 用滴管滴于培养皿滤纸上, 然后放入 3 龄荔枝若虫, 每一处理 5 头。

1.3 酶液制备

用供试的马尾松毛虫幼虫和荔枝若虫整体置于预冷的玻璃匀浆器中, 按 5 mL/g 体重加入 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 值 6.0), 在冰浴中匀浆, 并在 6000 r/min, 冷冻离心 20 min, 倾出上清液作为待测液, 保存于冰箱内。

1.4 多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase 简称为 PPO) 活力测定

用 2.8 mL/L 邻苯二酚 (pH 值 5.5) 加入 0.2 mL 酶液在 37°C 水浴中作用 5 min 后, 置于冰浴中终止反应, 用 724 微电脑分光光度计 (上海光学仪器厂制造) 在 420 nm 下测定 OD 值。

2 结果分析

2.1 多来宝对马尾松毛虫体内 PPO 活力的影响

正常马尾松毛虫体内的 PPO 活力值随虫龄增加而升高, 5 龄是 4 龄的 1.89 倍, 6 龄是 5 龄的 2.38 倍, 说明虫龄与酶活力的关系密切, 这与李周直的结果一致^[5]。用多来宝处理后, 5 龄幼虫的 PPO 活力于 100 min 时达最大值, 为正常虫体的 3.6 倍; 6 龄幼虫则在 150 min 时达最高值, 为正常虫体的 1.7 倍; 4 龄幼虫的多酚氧化酶活力变化比较平稳, 与正常虫体活力差异不大。(见表 1)

运用点滴法进行毒力测定表明, 5, 6 龄幼虫对多来宝抗性较强; 5, 6 龄幼虫的致死历时分别为 240 min 和 720 min; 而 4 龄幼虫致死历时仅为 150 min。以上结果表明, 5 龄和 6 龄幼虫的 PPO 对多来宝敏感, 即多来宝可能是马尾松毛虫老龄幼虫体内 PPO 的致活剂, 刺激和诱导了其活性上升, 并与 5, 6 龄幼虫的抗药性有关。这一点与李周直用氰戊菊酯处理后的结果^[4]不同, 说明多来宝可能与拟除虫菊酯的毒力机制不同, 把多来宝划入拟除虫菊酯类可能不合适, 有待进一步研究。

表 1 多来宝对马尾松毛虫体内 PPO 活力的影响

Table 1 Effect of etofenprox on the polyphenol oxidase (PPO) activity in *D. Punctatus*

虫龄 Instar	PPO 活力 PPO activity ¹⁾				正常虫体 Normal worm
	3 ²⁾	5 ²⁾	100 ³⁾	150 ²⁾	
4	59	36	45	47	45
5	229	195	308	145	85
6	195	175	235	337	202

1) 1 min 内 OD 值增加 0.01 为一个酶活力单位, 并以单位 /g 鲜重表示 OD increased 0.01 in one minute is one enzyme activity unit, and it is expressed unit/g fresh weight.

2) 处理时间 Handle time (min)

2.2 菟丝子 (CJ) + 夹竹桃 (NI) 醇提液及乙醇对荔枝 PPO 活力的影响

荔枝虫体经处理后其体内的 PPO 活力上升, 处理后 1 h 达最高值, 为正常虫体的 2.4 倍, 处理后 2 h 变化不大, 18 h 时明显下降。乙醇单独处理后 10 min, 荔枝 PPO 活力迅速提高为正常虫体的 2.7 倍 (见表 2)

表 2 菟丝子+ 夹竹桃醇提液及乙醇对荔枝 PPO 活力的影响

Table 2 Effect of CJ+ NI and alcohol on the polyphenol oxidase (PPO) activity in *T. popillosa*

虫龄 Instar	PPO 活力 PPO activity ¹⁾				乙醇处理 ³⁾ Alcohol	正常虫体 Normal worm (CK)
	0.5 ²⁾	1 ²⁾	2 ²⁾	18 ²⁾		
3 龄若虫 3 Instar nymph	108	133	127	13	152	56

1) 1 min 内 OD 值增加 0.01 为一个酶活力单位, 并以单位 /g 鲜重表示 OD increased 0.01 in one minute is one enzyme activity unit, and it is expressed unit/g fresh weight.

2) 处理时间 Handle time (h).

3) 乙醇浓度为 75%, 处理时间 10 min Concentration of alcohol is 75%, handle time in 10 min.

毒力测定表明 CJ+ NI 醇提液处理后 30 min 的击倒率为 40%, 死亡率为 10%, 均高于正常虫体 (对照处理均无击倒和死亡)。说明 CJ+ NI 醇提液有一定的毒理作用。用乙醇单独处理荔枝 10 min, PPO 急剧上升, 荔枝迅即被击倒和死亡, 说明 PPO 被促活上升, 可能是乙醇的作用, 而 PPO 的大量增加可能是活化过量导致的毒害作用^[5]。CJ+ NI 醇提液在 2 h 内 PPO 的活化上升不如乙醇在 10 min 的高而在 18 h 后急剧下降, 可能表明两种植物的醇提液对 PPO 具有抑制作用, 有待于进一步研究。

3 讨论

两种害虫对多来宝、菟丝子+夹竹桃醇提液及乙醇的反应表明,马尾松毛虫及荔枝体内的 PPO 均与抗药性有关。可以认为 PPO 是一种保护酶,但情况比较复杂。

1976年 Ratcliffe和 Rovley 将昆布糖 (Laminarin) 加入盔析翅蠨、大蜡螟等昆虫后发现,昆布糖增强了昆虫血细胞的吞噬作用,他认为这是由于昆布糖活化了虫体 PPO 之故^[7]。多来宝可能也类似于昆布糖的作用,是马尾松毛虫老龄幼虫体内 PPO 的诱导剂;而菟丝子和夹竹桃可能是荔枝 3 龄若虫体内 PPO 的抑制剂。诱导活化和抑制为两种相反的作用,它们均能导致害虫死亡,看去似乎矛盾,关键在于诱导活化过量后发生突变,反而对酶的活化有毒害作用。张宗炳等^[6] 1993 年报道,一些化合物对 PPO 活化时,会出现这种情况。所以高浓度的乙醇和多来宝可能是 PPO 的活化剂,和抑太保的作用机理相同,而和氰戊菊酯不同。

比较有前途的可能是菟丝子和夹竹桃,特别是菟丝子,可以成为不污染环境及符合“生物合理途径”

的新型杀虫剂,因此进一步研究其对多种害虫 PPO 活力的变化,对于了解昆虫的抗药机理,寻找更多的抑制剂来提高药效和保护环境具有现实意义。

参考文献

- 1 李兆麟等. 马尾松毛虫的光周期反应. 昆虫学报, 1994, 37 (1): 31~ 37.
- 2 Mornis Rockstein. Biochemistry of Insects. New York Academic Press, 1978. 151~ 156.
- 3 Harry Wheeley. Plant pathogenesis. New York Academic Press, 1975. 85~ 91.
- 4 吴刚, 尚稚珍. 抑太保对亚洲玉米螟表皮酚氧化酶及几丁质酶活力的影响. 昆虫学报, 1992, 35 (3): 306~ 311.
- 5 李周直. 马尾松毛虫蛋白质. 核酸酶和羧酸酯酶与耐药性关系. 昆虫学报, 1993, 36 (3): 296~ 301.
- 6 张宗炳, 冷欣夫. 杀虫药剂毒理及应用. 北京: 化学工业出版社, 1993, 331~ 337.
- 7 Ratcliffe M A, Gagen S J. Cellular defense reactions of insects hemocytes in vivo. nodule formation and development in Galleria mellonella and pieris brassicae larvae. J Invertebr Pathol. 1976, 28 (3): 3~ 382.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)

(上接第 45 页 Continue from page 45)

参考文献

- 1 Sheer DE. Sensory and Cognitive 40-Hz Event-related Potentials: behavioral Correlates, Brain Function and Clinical Application. Brain Dynamics 2, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1989.
- 2 Auerbach V, Sheer DE. Forty hertz EEG in learning disabled and normal boys. J Learn Disabi, 1988, (3): 15~ 17.
- 3 Spydell JD, Sheer DE. Forty Hertz EEG activity in Alzheimer's type dementia. psychophysiology, 1983, (20): 313~ 350.
- 4 Spydell JD, Sheer DE. Task dependent cerebral lateralization of the 40 Hz EEG rhythm. psychophysiology,

1979, (16): 347~ 350.

- 5 Ford M, Bred BC, Newton HA, Sheer DE. Maintenance and generalization of 40 Hz EEG biofeedback effects. Biofeedback Self Regul, 1980, (5): 193~ 205.
- 6 Loring DW, Sheer DE. Laterality of 40 Hz EEG and EWG during cognitive performance. Psychophysiology, 1983, 21: 34~ 38.
- 7 Simon HA. How big is a chunk? Science, 1974, 183, 482~ 488.
- 8 Miller G A. The magical number seven, plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. Psych Rev. 1956, 63: 81~ 97.
- 9 张武田. 汉字字词的短时记忆容量. 心理学报, 1986, (2): 133~ 139.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)