

食料对烟草甲药剂敏感性及其共生菌和解毒酶活性的影响

张晓梅^{1,2}, 薛宝燕³, 程新胜^{1*}, 查向东²

(1.中国科学技术大学烟草与健康研究中心, 合肥 230052; 2.安徽大学生命科学学院, 合肥 230039;
3.安徽省烟草公司, 合肥 230033)

摘要: 从食料-昆虫-药剂三者的关系出发, 研究了由甘草、麦粒和烤烟 3 种食料饲养的烟草甲幼虫对药剂敏感性及其体内共生菌数量和酶活性的变化。结果表明, 取食不同食料的烟草甲幼虫对供试杀虫剂的敏感性有较明显的差异, 以麦粒饲养的烟草甲幼虫耐药性最强, 烟草和甘草饲养的较弱。麦粒饲养的烟草甲幼虫中肠处的共生菌数量明显多于其它 2 种食料饲养的。同时, 食料也不同程度地影响了烟草甲幼虫体内的解毒酶活性。

关键词: 烟草甲; 食料; 药剂敏感性; 共生菌; 解毒酶

中图分类号: S435.72

文献标识码: A

文章编号: 1007-5119 (2008) 05-0044-04

Effects of Diets on Susceptivity to Insecticides, Yeast-like Symbionts and Activity of Detoxifying Enzymes in Cigarette Beetles

ZHANG Xiaomei^{1,2}, XUE Baoyan³, CHENG Xinsheng^{1*}, ZHA Xiangdong²

(1. Research Center of Tobacco and Health of USTC, Hefei 230052, China; 2. School of Life Science of Anhui University, Hefei 230039, China; 3. Anhui Tobacco Corporation, Hefei 230033, China)

Abstract: From the diet-insect-insecticide's relation, the influence of diets on the larvae of cigarette beetles was investigated. The diets included liquorice, kernel and flue-cured tobacco. The results showed that the diets could apparently change the susceptibility of larvae of cigarette beetles to insecticides, and the larvae fed with kernel featured the strongest resistance, and the larvae fed with liquorice showed the weakest resistance. The diets also had a evident effect on abundance of yeast-like symbionts (YLS) in the body of 5th instar larvae. The larvae fed with kernel had more YLS than the others. Besides, the diets also affected the activity of detoxifying enzymes (CarE and GSTs) of larvae.

Keywords: cigarette beetles; diets; susceptibility to insecticides; yeast-like symbionts; detoxifying enzymes

大量研究表明, 昆虫可以通过自身一些酶的作用对其摄入的植物次生性物质及其它外源化合物进行解毒代谢, 而参与这一作用的主要酶系为氧化酶、水解酶、转移酶和还原酶^[1]。对烟蚜 (*Myzus persicae*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera. Exigua*)、南美斑潜蝇 (*L iriom yza huidobrensis*) 等昆虫的研究显示^[2-4], 不同寄主植物所含的次生物质不同, 对植食性昆虫体内的解毒酶影响也不同。烟草甲 (*Lasioderma serricorne Fabricius*) 是一种多食性昆虫, 其前肠和中肠交接处的菌胞体内有类似酵母的胞内共生菌

(Yeast-like Symbionts, YLS) *Symbiotaphrina kochii*^[5-6]。这些共生菌能合成烟草甲生长所必需的维生素、氨基酸和甾醇。同时, YLS 产生水解酶, 能对广谱性杀虫剂、真菌毒素和植物毒素进行解毒, 从而有益于烟草甲的存活与生长^[6-9]。不同食料对烟草甲的生长发育和共生菌数量有着明显的影响^[10], 但是否同样影响其对杀虫剂的敏感性未见报道。本文对取食不同食料的烟草甲对杀虫剂的敏感性及其解毒酶活性的变化进行了研究, 以期揭示食物对烟草甲杀虫剂敏感性的影响及其可能的原因。

基金项目: 国家烟草专卖局资金资助项目(110200302016)

作者简介: 张晓梅 (1984-), 女, 在读研究生, 主要从事昆虫化学生态学研究。*通讯作者, E-mail: xscheng@ustc.edu.cn

收稿日期: 2007-12-15

1 材料与方法

1.1 烟草甲的饲养观察

供试饲料包括甘草（1mm 厚的薄片，内蒙古产）、烤后烟叶（含水率 13%，云南大理 B2F）及小麦麦粒（皖麦 48）。烟草甲采自安徽省内 1 个烟叶仓库，并在实验室用人工饲料饲养至第 3 代。

1.2 共生菌数量的测定

参照傅强等^[11]的方法，观察不同食料饲养的 5 龄期烟草甲体内 YLS 的数量：取 5 头试虫，加入 200 μL 0.9% 生理盐水将试虫研磨、匀浆后，直接吸取 2 μL 匀浆液滴于血细胞计数器上，用双目显微镜（Olympus BH2）在 10 \times 40 倍下记数 YLS 的数量，每样 2 次镜检，各处理 3 次重复。

YLS 数量按下列公式计算：样品 YLS 含量 = 镜检 YLS 数 \times 研磨用生理盐水体积/镜检液体积；单头试虫所含 YLS 数 = 样品 YLS 含量/取样试虫数。

1.3 供试药剂

甲基嘧啶磷（pirimiphos-methyl）85%原油（福建三明农化股份公司生产），以丙酮稀释至 100、200、400、800、1200 mg/L；四溴菊酯（tralomethrin 日本曹达公司提供）：以丙酮稀释至 50、100、200、400、600 mg/L；敌敌畏（dichlorvos）80%乳油（河北新丰农药化工股份有限公司）：以蒸馏水稀释至 100、200、400、800、1200 mg/L。所用药剂均在使用前稀释配制。

1.4 触杀毒力测定

用毛笔将烟草甲 5 龄幼虫轻移至玻璃培养皿中（ Φ 9 cm），轻轻刷去虫体上的食物残渣，每个培养皿中放置 20 头。室温下，用 1 μL 微量进样器，取 0.1 μL 的药液点滴在试虫腹部，处理后将试虫放入人工气候箱内（30 $^{\circ}\text{C}$ 、RH75%），72 h 后，在实体显微镜下检查结果：用毛笔轻触虫体，不动者即视为死亡。每处理 3 次重复。

1.5 烟草甲酶活性的测定^[12]

1.5.1 羧酸酯酶活性测定（CarE） 取 5 龄幼虫 5 头，加 pH7.0、0.04 mol/L 的磷酸缓冲液 5 mL，冰浴匀浆，3 000 转/分离心 10 min，冰浴待测。以 α -NA（ 3×10^{-4} mol/L，含 10^{-4} mol/L 的毒扁豆碱）为底

物，经酯酶水解后生成 α -萘酚与显色剂（5% SDS：1% 固蓝 B 盐 = 5：2）作用呈现深蓝色，于分光光度计 600 nm 处测 OD 值。根据制作的标准曲线和酶源蛋白含量，将 OD 值换算成比活力 mmol /（mgPro \cdot 30 min）。

1.5.2 谷胱甘肽转移酶活性测定（GSTs） 5 龄幼虫 5 头，加 2 mL 66 mM pH7.0 的磷酸缓冲液（含 2 mM EDTA），冰浴匀浆，匀浆液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，10000 转/分离心 60 min。以 0.03 mol/L 的 CDNB（1-氯-2,4-二硝基苯）为底物，在酶的催化下生成的复合物在 340 nm 下有最大吸收峰，在 27 $^{\circ}\text{C}$ 下于 751 分光光度计 340 nm 处，测定记录 5 min 内 OD 变化值，比活力单位为 OD/（mgpro \cdot min）。

1.6 酶源蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝 G-250 染色法：取 1 mL 酶液，加入 5 mL 染料溶液，混匀，5 min 后，在分光光度计 595 nm 处测其 OD 值，对照标准曲线求得蛋白质浓度。

2 结果

2.1 不同食料饲养的烟草甲的药剂敏感性变化

由表 1 可知，不同食料饲养的烟草甲幼虫对甲基嘧啶磷的敏感性是不同的。甲基嘧啶磷对由烤烟饲养的烟草甲幼虫毒力最强，其 LC_{50} 为 277.33 mg/L；对由麦粒饲养的烟草甲幼虫的毒力最小，其 LC_{50} 为 334.97 mg/L；取食烤烟的处理与其它 2 处理间差异显著。四溴菊酯对取食不同食料的烟草甲幼虫的毒力亦呈现一定差异，对烤烟饲养的烟草甲幼虫毒力最大，对麦粒饲养的烟草甲幼虫的毒力最小，2 处理间差异显著。不同食料饲养的烟草甲幼虫对敌敌畏的敏感性也表现出明显的不同，敌敌畏对麦粒饲养的烟草甲幼虫毒力最大，其 LC_{50} 为 348.34 mg/L；对甘草饲养的烟草甲幼虫的毒性次之；而对烤烟饲养的烟草甲幼虫的毒性最小，其 LC_{50} 为 568.85 mg/L；甘草与麦粒的处理间差异不显著，但烤烟与其它 2 处理间差异显著。

2.2 食料与 YLS 数量之间的关系

图 1 结果显示，麦粒饲养的烟草甲体内的 YLS

表 1 3 种不同药剂对不同食料饲养的烟草甲幼虫的毒力
Table 1 Toxicity of the larvae of cigarette beetles fed by different diets to three different insecticides

药剂	食料	毒力回归方程	LC ₅₀ /mg·L ⁻¹	95%置信限	R ²
甲基嘧啶磷	麦粒	y=2.0438x-0.1598	334.97±0.0398a	279.8981-400.8667	0.9938
	甘草	y=1.4834x+1.3285	298.54±0.0533a	234.6929-379.7519	0.9979
	烤烟	y=2.0221x+0.0605	277.33±0.0403b	231.2065-332.6596	0.9192
四溴菊酯	麦粒	y=1.4894x+1.5640	202.77±0.0516a	160.6571-255.9175	0.9475
	甘草	y=1.6665x+1.2199	185.35±0.0471ab	149.8649-229.2451	0.9854
	烤烟	y=1.7653x+1.1227	157.04±0.0446bc	128.4103-192.0437	0.9880
敌敌畏	烤烟	y=1.7989x+0.0433	568.85±0.0446a	465.1575-695.6648	0.9822
	甘草	y=1.5312x+1.1015	351.56±0.0502b	280.2851-440.9608	0.9878
	麦粒	y=1.9567x+0.0254	348.34±0.0413b	128.4103-192.0437	0.9850

注：数据后相同字母表示在 0.05 水平下差异不显著。下同。

数量明显高于其它 2 种食料的，总体表现为麦粒>烤烟>甘草。Duncan 差异性分析表明，各食料饲养的烟草甲体内的 YLS 差异性显著。

2.3 不同食料饲养的烟草甲的解毒酶活性的变化

表 2 结果表明，食料不同程度地影响了烟草甲 5 龄幼虫体内的解毒酶活性。以甘草饲养的烟草甲幼虫体内 CarE 活性最高，以麦粒饲养的烟草甲幼虫 CarE 活性最低，甘草处理与其它 2 处理间差异性显著；各处理间 GSTs 的差异显著，以烤烟饲养的烟草甲的 GSTs 活性最高，达 0.1008 OD/(mg pro·min)，最小的为甘草饲养的烟草甲幼虫，GSTs 活性仅为 0.0283 OD/(mg pro·min)，与烤烟饲养的相差近 4 倍。

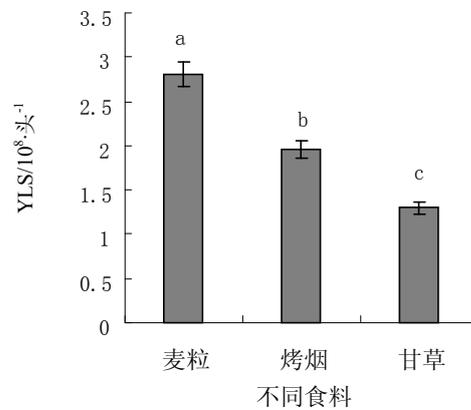


图 1 烟草甲 5 龄幼虫体内的共生菌数量

Fig. 1 The number of YLS of the 5 ages larvae of cigarette beetles

表 2 食料对烟草甲幼虫解毒酶活性的影响
Table 2 Effect of the diets on activity of CarE and GSTs in the larvae of cigarette beetles

食料	羧酸酯酶 CarE		谷胱甘肽转移酶 GSTs	
	酶活力/mmol·(mgPro·30min) ⁻¹	比活	酶活力/OD·(mgPro·min) ⁻¹	比活
甘草	0.0021±0.0004a	1.91	0.0283±0.0007c	1.00
烤烟	0.0016±0.0001b	1.45	0.1008±0.0003a	3.56
麦粒	0.0011±0.0001b	1.00	0.0682±0.0001b	2.41

3 讨论

实验结果表明，取食不同的烟草甲幼虫对 3 种供试杀虫剂的敏感性有较明显的差异。就 3 种药剂而言，四溴菊酯对烟草甲 5 龄幼虫的触杀毒力最大、敌敌畏最小、甲基嘧啶磷的触杀毒力居中。综合来看，以麦粒饲养的烟草甲幼虫耐药性最强，烟草和甘草饲养的较弱。但是，在对敌敌畏的耐药性上则是以烟草饲养的烟草甲 5 龄幼虫的最强，这可能与我国在烟草仓库长期使用敌敌畏^[13]有关，使取食烟草的烟草甲对敌敌畏形成了较强的耐药性。

麦粒的营养丰富，有利于烟草甲的生长、繁殖^[14]，同时麦粒饲养的烟草甲中肠处的 YLS 明显多于其它 2 种食料饲养的，这样就使得麦粒饲养的烟草甲幼虫有着较高的耐药性。由于烟叶中的次生物质（如烟碱、多酚）能诱导昆虫的 GSTs 活性^[15]，而 GSTs 在敌敌畏分解代谢中起着重要作用^[16]，GSTs 活性的提高可能是取食烟叶的烟草甲对敌敌畏耐药性增加的原因之一。

本试验可以看出，烟草甲体内的 YLS 数量与烟草甲体内 2 种解毒酶活性间关系并不一致，且 YLS

与 CarE 间似呈负相关, 但 Samuel K S 等研究表明, 外源生物物质能诱导烟草甲肠中 YLS 的羧酸酯酶活性增加, YLS 在烟草甲体内的功能之一就是帮助寄主解毒^[17]。因此, 应该对烟草甲幼虫身体不同部位 CarE 及 GSTs 的活性进行分析, 以便进一步明确 YLS 数量与烟草甲体内解毒酶活性间的关系。

参考文献

- [1] 高希武, 马军. 害虫的化学防治与作物抗虫性[J]. 中国农业大学学报, 1998, 3 (1): 75-82.
- [2] 宋春满, 高家合, 邓建华, 等. 寄主植物对云南烟蚜解毒酶和靶标酶活力的影响[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24 (3): 241-243.
- [3] 吴承春, 王沫. 不同食料对甜菜夜蛾药剂敏感性及其解毒酶活性的影响[J]. 农药学学报, 2003, 5 (1): 56-60.
- [4] 魏秋学, 何玉仙, 杨秀娟, 等. 寄主植物对南美斑潜蝇羧酸酯酶及乙酰胆碱酯酶活力的影响[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26 (3): 345-347.
- [5] Noda H and Kodama K. Phylogenetic position of yeast-like endosymbionts of anobiid beetles [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(1): 162-167.
- [6] Ryan L. Post-harvest infestation control [M]. London: Chapman & Hall, 1995: 5-18.
- [7] Dowd P F. In situ production of hydrolytic detoxifying enzymes by symbiotic yeasts in cigarette beetle (Coleoptera, Anobiidae) [J]. J Econ Entomol, 1989, 82: 396-400.
- [8] Dowd P F and Shen S K. The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*) [J]. Entomol Exp Appl, 1990, 56: 241-248.
- [9] 薛宝燕, 程新胜, 魏重生, 等. 烟草甲体内共生菌的初步研究[J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17 (4): 270-271.
- [10] 薛宝燕, 陈树仁, 程新胜, 等. 食料对烟草甲共生菌数量和生长发育的影响[J]. 昆虫知识, 2006, 43 (1): 50-53.
- [11] 傅强, 张志涛, 胡萃, 等. 高温处理后褐飞虱体内共生酵母菌和氨基酸需求的变化[J]. 昆虫学报, 2001, 4 (4): 534-540.
- [12] 慕立文. 植物化学保护研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 148-161.
- [13] 牛新生, 任中成, 蒋阿定, 等. 高大连体包装仓磷化氢与敌敌畏烟剂混合环流熏蒸试验[J]. 粮食贮藏, 2007 (5): 25-27.
- [14] 姚洪渭, 叶恭银, 程家安. 寄住植物影响害虫药剂敏感性的研究进展[J]. 昆虫学报, 2002, 45 (2): 53-264.
- [15] 周郑, 程新胜, 王方晓, 等. 烟碱和芸香对斜纹夜蛾药剂敏感性及相关酶活性的影响[J]. 农药学学报, 2007, 9 (3): 305-308.
- [16] 唐振华, 毕强. 杀虫剂作用的分子行为[M]. 上海: 上海远东出版社, 2003: 119-120.
- [17] Samuel K S and Patrick F D. Xenobiotic induction of esterases in cultures of the yeast-like symbiont from the cigarette beetle [J]. Entomol Exp Appl, 1989, 52: 179-184.

(责任编辑 迟立鹏)