

· 研究简报 ·

灭幼脲 I 号对致倦库蚊 DNA 代谢的影响

甘才光 吴秋雁 仇序佳

(昆虫学研究所)

摘 要

本文运用生化测定、放射性同位素标记及显微放射自显影等技术方法研究了灭幼脲 I 号对致倦库蚊 DNA 代谢的影响。结果表明,灭幼脲 I 号抑制了致倦库蚊的 DNA 合成,降低 DNA 含量。

关键词 灭幼脲,致倦库蚊,DNA 代谢

灭幼脲是一种昆虫生长调节剂^[1,2],由于它的杀虫效应较为缓慢,称之为制虫剂(Insectistatics)。灭幼脲高效低毒、制虫范围广,是一种很有发展前途的新型杀虫剂。

一般认为,灭幼脲主要是抑制昆虫表皮的几丁质合成,造成昆虫蜕皮困难、变态受阻而死亡。我们在试验中曾观察到,经灭幼脲处理后,许多幼虫死于幼虫期,这显然与几丁质合成无大关系,因而几丁质合成受阻的理论便不足以解释这些现象。为此,我们从生化角度探讨了灭幼脲 I 号对致倦库蚊幼虫和卵 DNA 代谢的影响,以期对灭幼脲的制虫机理提供科学的依据。

1 材料和方法

1.1 测试药剂 灭幼脲 I 号由江苏省金坛昆虫激素研究所合成,样品的结晶纯度 >95%,学名为 1-(4-氯苯基)-3-(2,6-二氟苯甲酰基)脲。称取灭幼脲 I 号结晶粉末 5 mg,加入 0.5 ml 丙酮及 2、3 滴吐温-80,然后加蒸馏水溶解,定容至 50 ml,配成浓度为 100 ppm 的母液,置冰箱保存,用时按各项实验所需浓度进行稀释。

1.2 测试虫种 试验用蚊虫为室内饲养繁殖多代的致倦库蚊(*Culex pipiens quinquefasciatus*)四龄幼虫和卵。幼虫置恒温室(温度 26~28°C,相对湿度 70~90%,光照 12 小时)内用清水饲养,每天用 75% 面粉、20% 黄豆粉、2.5% 猪肝粉和 2.5% 的酵母粉组成的混合饲料喂饲。试验用卵块系成虫羽化 3~5 天后用小白鼠喂血,然后收集雌蚊于晚上关灯后不久所产出的卵块。

1.3 测试方法 用 500 ml 烧杯盛放浓度为 1 ppm 的药液 400 ml 和四龄幼虫 250 头,用于放射性同位素标记试验的幼虫和卵则同时再用微量注射器吸取³H-胸腺嘧啶核苷(放射性浓度为 1 mCi/ml,中科院上海原子核研究所生产)注入药液中,使其放射性浓度为 1 μCi/ml;同样条件下设对照。幼虫每隔 2, 6, 12, 24, 48 小时取一次样,处理组因

本文 1989 年 1 月 7 日收到

幼虫期延长故还取72和96小时的样品;卵每隔3,6,9,12,18,24,36小时取一次样。DNA含量测定时每处理取200头幼虫,共3次重复;同位素测定时,幼虫每处理取一头,共30次重复;卵每处理取200个,共15次重复。用滤纸吸干体表的水分,称重,参照Chinzel & Tojo^[3]的方法提取核酸,用二苯胺法测定幼虫DNA含量;参照DeLoach等^[4]的方法处理样品,测定幼虫和卵体内³H-胸腺嘧啶核苷的放射性,记录cpm数,并对幼虫进行放射自显影观察。

2 结果

2.1 灭幼脲 I 号对四龄幼虫DNA含量的影响 实验结果如图1所示。正常幼虫在四龄初期, DNA含量增加不大,随着发育的进行,第12小时出现一个峰值,随后下降,第24小时接近四龄初期的水平,然后又不断上升,到第48小时即将化蛹前,达到最高。经灭幼脲 I 号处理的四龄幼虫,在最初6小时内, DNA含量与对照相比差异不大,但到了第12小时, DNA合成开始受到抑制,含量下降,为对照的90.4%;随后继续下降,到第24小时为对照的82.9%。此后和正常的幼虫一样又回复上升,第48小时达到最高点,但也只有对照的79.3%。由于幼虫延期化蛹,在延期中DNA含量一直下降,于第96小时降到最低点。

从实验结果可以看出,灭幼脲 I 号对DNA合成的影响主要表现在中后期。显著性测验表明,从第12小时开始,处理与对照之间就表现出显著差异($P < 0.05$),第24小时后,差异表现得非常显著($P < 0.001$)。从处理的幼虫DNA含量占对照的百分比来看,也是第24和第48小时相差较大。尽管幼虫期延长时间近1倍(96小时),但DNA含量始终未能回升,这些结果表明,灭幼脲 I 号对幼虫的DNA含量是有明显影响的,同时也可看出灭幼脲的迟效趋势。

2.2 灭幼脲 I 号对³H-胸腺嘧啶核苷掺入幼虫DNA的影响 试验结果表明,在最初一段时间,对照组与处理组之间,³H-胸腺嘧啶核苷掺入DNA没有差异,但从处理6小时开始,其掺入就表现出差异;处理12小时以后,差异表现得非常显著(图2)。这表明灭幼脲 I 号对³H-胸腺嘧啶核苷掺入DNA具有强烈的抑制作用。

试验结果还表明,灭幼脲抑制作用的大小与其浓度有关,浓度越大,³H-胸腺嘧啶核苷的掺入率越低。例如,0.5ppm和1ppm处理12小时,掺入率分别为对照的61.8%和7.2%,处理24小时,掺入率分别为对照的67.8%和53.9%。从图2还可以看出,无论对照组还是处理组,掺入DNA中的³H-胸腺嘧啶核苷是在不断增加的,只是各自增加的幅度不同,对照组增幅较大,第48小时已达3285cpm/幼虫,而处理组则由于灭幼脲的抑制作用,增幅较小,到48小时分别为2014cpm/幼虫和1981cpm/幼虫,到第96小时也只达到2556cpm/幼虫,但两组总趋势并不出现下降的现象,原因在于掺入DNA中的³H-胸腺嘧啶核苷不断的累积。

2.3 ³H-胸腺嘧啶核苷掺入四龄幼虫DNA的显微放射自显影观察 观察结果表明,在四龄幼虫的真皮细胞、消化道中肠、后肠等细胞内都发现有³H-胸腺嘧啶核苷的进入,但³H-胸腺嘧啶核苷进入细胞核所占的细胞数目(细胞标记率),对照组均显著高于处理组,见表1。

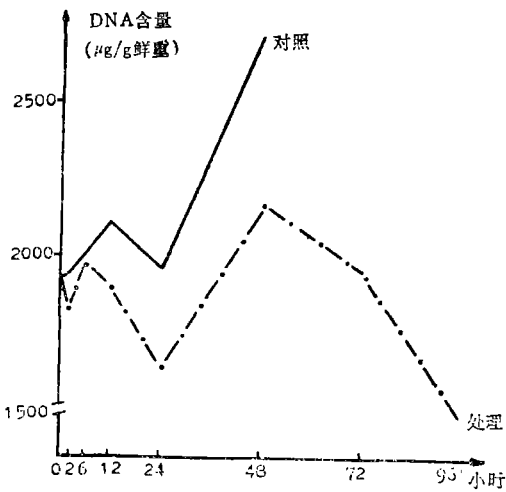


图1 灭幼脲 I 号对四龄幼虫 DNA 含量的影响
Fig.1 The effects of diflubenzuron on the content of DNA in the 4th instar larvae

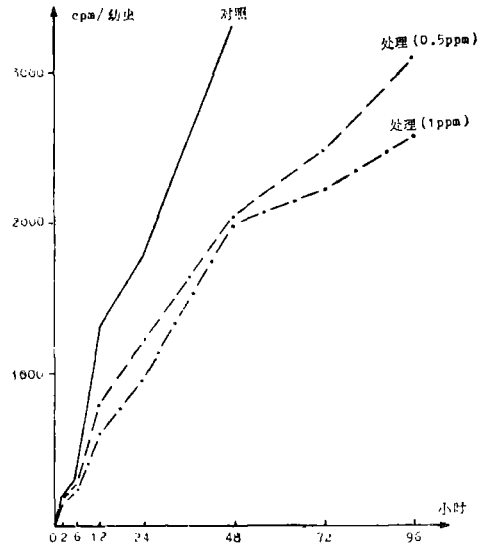


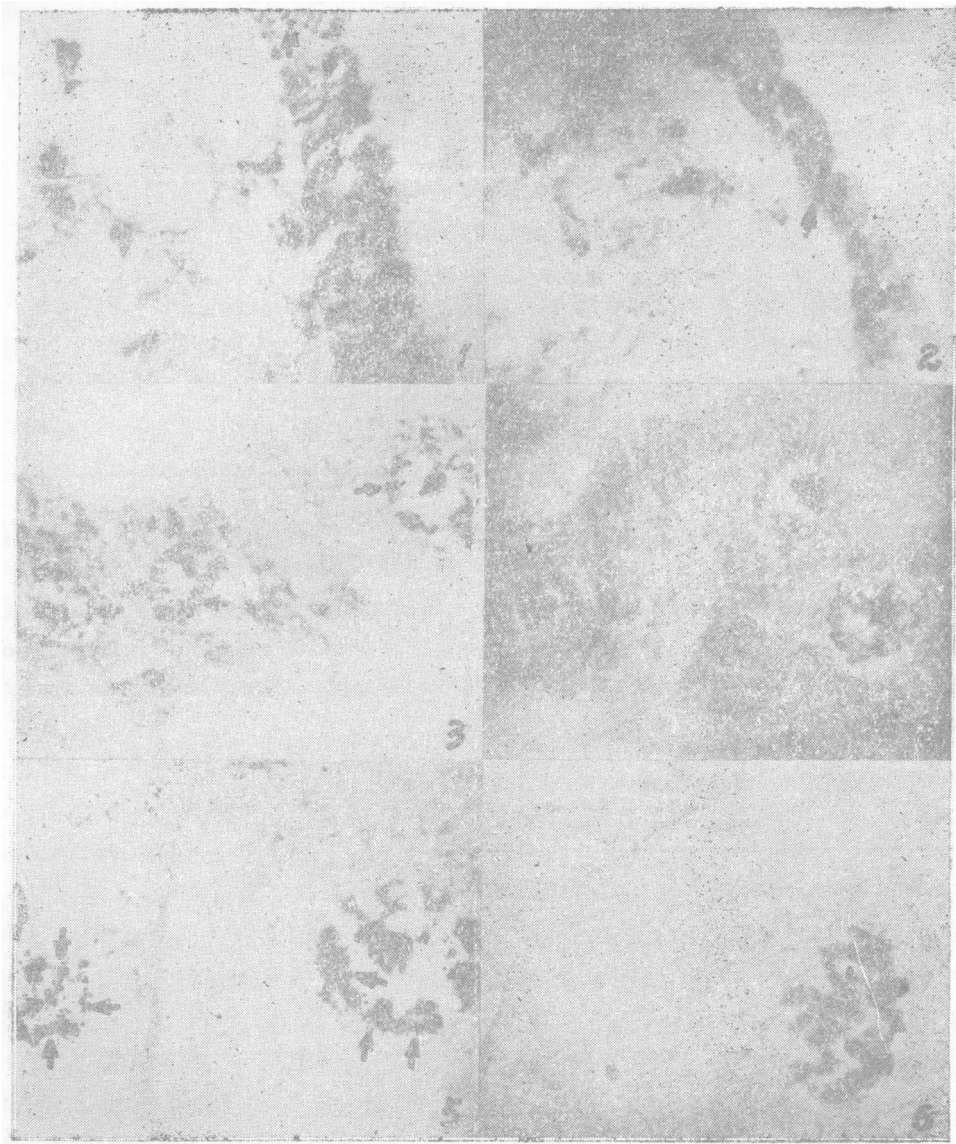
图2 灭幼脲 I 号对³H-胸腺嘧啶核苷掺入四龄幼虫 DNA 的影响
Fig.2 The effects of diflubenzuron on the ³H-thymidine incorporation into DNA of the 4th instar larvae

表1 ³H-胸腺嘧啶核苷掺入四龄幼虫 DNA 的放射自显影观察结果
Tab.1 Observation results of micro-radioautography of the ³H-thymidine incorporation into DNA of 4th instar larvae

观察部位	时间 (小时)	方式	细胞数目 (个/单个视野) ($\bar{X} \pm SD$)	³ H-胸腺嘧啶核苷进入细胞核的细胞数 (个/单个视野) ($\bar{X} \pm SD$)	细胞标记率 (%)	T 检验	处理 / 对照 (%)
消化道	48	对照	25.00 ± 2.83	22.33 ± 3.09	89.3	p < 0.001	35.4
		处理	34.67 ± 5.04	11.00 ± 2.74	31.7		
真皮	48	对照	9.50 ± 1.50	7.50 ± 0.50	78.9	p < 0.001	44.4
		处理	10.00 ± 2.06	3.50 ± 0.50	35.0		
真皮	48	对照	42.51 ± 3.54	33.06 ± 4.17	77.8	p < 0.001	39.1
		处理	50.39 ± 5.46	15.34 ± 2.86	30.4		

此外，进入细胞核的³H-胸腺嘧啶核苷的数目，对照组也明显高于处理组，见表2及图版。

2.4 灭幼脲 I 号对³H-胸腺嘧啶核苷掺入卵 DNA 的影响 试验结果表明，灭幼脲 I 号对³H-胸腺嘧啶核苷掺入卵 DNA 亦产生抑制作用，效果也十分显著。T 检验显示，从胚胎发育的第 9 小时开始，³H-胸腺嘧啶核苷掺入的差异便表现得很显著。与四龄幼虫 DNA 一样，掺入卵 DNA 的³H-胸腺嘧啶核苷也有累积现象，呈现不断上升趋势，第 24



图版 四龄幼虫的显微放射自显影照片

Plate Photographs of micro-radioautography of the 4th instar larvae

1. 对照组, 第48小时四龄幼虫真皮细胞, 示细胞核内银颗粒(箭头指处), $1000\times$.
2. 处理组, 第48小时四龄幼虫真皮细胞, 细胞核内银颗粒甚少或无, $1000\times$.
3. 对照组, 第48小时四龄幼虫消化道(中肠)细胞, 箭头指处为银颗粒, $1000\times$.
4. 处理组, 第48小时四龄幼虫消化道(中肠)细胞, 细胞核内银颗粒甚少或无, $1000\times$.
5. 对照组, 第48小时四龄幼虫消化道(后肠)细胞, 示细胞核内银颗粒, $1000\times$.
6. 处理组, 第48小时四龄幼虫消化道(后肠)细胞, 细胞核内几乎无银颗粒, $1000\times$.

表 2 ³H-胸腺嘧啶核苷掺入四龄幼虫 DNA 的放射自显影观察结果

Tab.2 Observation results of micro-radioautography of the ³H-thymidine incorporation into DNA of 4th instar larvae

观察部位	时间 (小时)	进入细胞核的 ³ H-胸腺嘧啶核苷数目(个/细胞核)		T 检验	处理/对照 (%)
		对 照 ($\bar{X} \pm SD$)	处 理 ($\bar{X} \pm SD$)		
消 中肠	48	20.43 ± 3.59	8.20 ± 1.74	p < 0.001	40.1
化 后肠	48	24.03 ± 3.05	7.86 ± 0.83	p < 0.001	32.7
真 皮	48	19.40 ± 2.25	7.30 ± 1.42	p < 0.001	37.6

小时为1721cpm/200个卵；但经处理的卵，³H-胸腺嘧啶核苷的掺入受到抑制，因而累积较慢，第24小时只达1341cpm/200个卵，故呈较平缓上升状态，见图3。

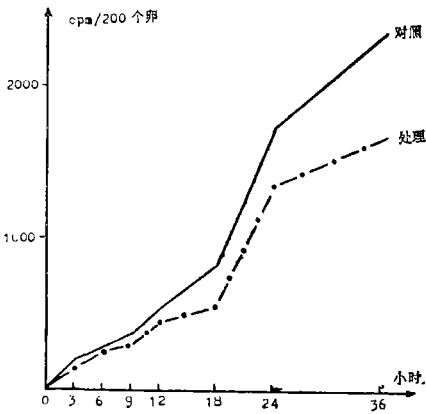


图3 灭幼脉 I 号对³H-胸腺嘧啶核苷掺入卵DNA的影响

Fig.3 The effects of diflubenzuron on the ³H-thymidine incorporation into DNA of the eggs

3 讨 论

目前，已有越来越多的证据表明，灭幼脉除了抑制几丁质合成以外，还对昆虫的其他代谢过程产生影响，尤其是对核酸代谢产生影响^[4~6]。我们的试验结果也表明，灭幼脉 I 号干扰了致倦库蚊体内正常的 DNA 代谢。一般说来，DNA 代谢被干扰，会对昆虫的生命活动产生极为不利的效果。昆虫体内一般存在两类 DNA，其生理功能各不相同。一类是核 DNA (基因 DNA)，其代谢稳定，含量少且恒定，主要功能是传递遗传信息；另一类 DNA 统称为代谢 DNA，包括核仁 DNA、线粒体 DNA 和卵黄 DNA 等，其特点是代谢不稳定，含量多变化大。代谢 DNA 主要由多倍化现象产生，能使 DNA 的量巨增；有的还具有基因放大作用，能大大增加细胞合成蛋白质的能力。昆虫

的生殖细胞、滤泡细胞、脂肪体细胞、多种腺体细胞等都存在这种代谢 DNA，它们直接参与昆虫的生长、发育、变态、生殖等代谢活动。由于灭幼脉对 DNA 合成具有抑制作用，自然使昆虫的上述代谢活动受到影响，从而导致蚊虫生长发育迟缓，最终死亡。所以，灭幼脉之所以具有制虫效应的一个很重要的原因，是它干扰了 DNA 的正常代谢。我们的试验结果还显示，在试验处理初期，对照组与处理组之间，³H-胸腺嘧啶核苷掺入 DNA 没有显著差异，处理 12 小时以后，³H-胸腺嘧啶核苷的掺入的差异便表现

得很显著, 这表明灭幼脲 I 号对致倦库蚊 DNA 合成的抑制作用主要表现在中后期, 这可能与灭幼脲的迟效性有关。

参 考 文 献

- [1] Wellinga K et al., *J. Agric. Food Chem.*, 21(1973a), 348~54
- [2] Wellinga K et al., *J. Agric. Food Chem.*, 21(1973b), 993~8
- [3] Chinzal Y et al., *J. Insect Physiol.*, 18(1972), 1638~98
- [4] Deloach J R et al., *Pestic. Biochem. Physiol.*, 15(1981), 172~87
- [5] Mitlin N et al., *Pestic. Biochem. Physiol.*, 7(1981), 559~63
- [6] Soltani N et al., *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21((1984), 256~64

The Effects of Diflubenzuron on the DNA Metabolism of *Culex pipiens quinquefasciatus*

Gan Caiguang* Wu Tsiuyan Qiu Xujia

Abstract

This paper deals with the effects of diflubenzuron on the DNA metabolism of the mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. The experiments were conducted by means of biochemical assay, radioactive isotope label and micro-radioautography. The results are as follows: (1) The content of DNA in the control group of the 4th instar larvae was significantly higher than that in the treated group; (2) The ³H-thymidine incorporation into DNA of the treated larvae and eggs was inhibited strongly by diflubenzuron; (3) The observation of micro-radioautography showed that the numbers of the silver granules into the cells of epidermis and digestive tract in the treated group were obviously fewer than those in the control group and the ratios of labelled cells were also decreased. These results indicate that diflubenzuron affects the DNA metabolism of the mosquitoes and, therefore, retards the growth and development of the mosquitoes and causes them to die at last.

Keywords diflubenzuron, *Culex pipiens quinquefasciatus*, DNA metabolism

*Institute of Entomology