

松油烯-4-醇对粘虫体内保护酶活力的影响^{*}

马志卿¹, 颜瑞莉¹, 陈根强¹, 李喜梅², 张 兴¹

(1 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省太白山国家级自然保护区管理局, 陕西 眉县 722300)

[摘 要] 以松油烯-4-醇处理粘虫5龄幼虫后, 测定了兴奋期、痉挛期、麻痹期及复苏期4个中毒阶段试虫的保护酶活性。结果表明, 超氧化物歧化酶(SOD)被明显激活, 各中毒阶段的酶活力均极显著高于对照, 其中兴奋期的酶活力最大, 为对照的3.04倍; 处理试虫的过氧化氢酶(CAT)在兴奋期和痉挛期与对照的差异不大, 而在麻痹期和复苏期被明显抑制, 酶活力分别为对照的78%和92%; 过氧化物酶(POD)也被明显抑制, 各中毒阶段的酶活力依次为对照的81%, 86.0%, 65.0%和90.0%。分析认为, 中毒试虫的复苏可能与POD和CAT活力的变化有关。

[关键词] 松油烯-4-醇; 粘虫; SOD; CAT; POD

[中图分类号] Q965.9; S482.39

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)10-0085-04

昆虫等生物体内存在由超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及过氧化物酶(POD)构成的保护酶系统, 这3种酶系协调一致, 处于动态平衡而使自由基维持在一个较低水平, 从而防止其产生毒害^[1,2]。在低温等逆境中, 昆虫体内的保护酶系统会发生明显变化^[3~5]。在农田生态系统中, 非杀虫药剂也可影响昆虫的保护酶系统, 如褐飞虱长期取食经除草剂处理的水稻后, 其体内SOD活性明显高于对照, POD也不同程度地高于或低于对照^[6]。杀虫药剂对昆虫保护酶的影响更为明显, 该酶系的变化或与中毒死亡有关^[7], 或与昆虫的耐药性有关^[2]。松油烯-4-醇是砂地柏精油中的主要杀虫活性物质, 对玉米象、赤拟谷盗、家蝇、小菜蛾、粘虫等昆虫均具有较强烈的熏蒸、触杀作用^[8]。中毒症状研究表明, 试虫以松油烯-4-醇处理后很快中毒, 依次表现出兴奋、痉挛、麻痹等症状, 部分麻痹的试虫经过一段时间后会复苏, 即恢复一定的生命活力, 但最终仍会死亡^[9]。目前, 关于松油烯-4-醇的杀虫作用机理尚不清楚, 可能与 Na^+ , K^+ -ATPase被抑制有关, 但复苏期试虫的 Na^+ , K^+ -ATPase活力较麻痹期还要低^[9], 说明已麻痹试虫的复苏与 Na^+ , K^+ -ATPase活力无关, 其机理较为复杂, 可能与昆虫体内的解毒酶或保护酶系统有关。本研究测定了松油烯-4-醇对粘虫幼虫保护酶活性的影响, 旨在为阐明其杀虫作

用机理提供线索和依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

粘虫(*Mythimna separata* Walker): 室内饲养(室温 (25 ± 1) °C; 相对湿度70%~80%; 光照时间/黑暗时间为12 h/12 h)种群, 由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心养虫室提供, 选择个体大小一致、活泼、健康的5龄幼虫供试。

1.2 供试药剂

松油烯-4-醇(含97%原油)购自北京百灵威公司。

1.3 试验方法

试虫处理 将试虫饥饿4 h后, 以0.137 mg松油烯-4-醇点滴处理, 于兴奋期、痉挛期、麻痹期、复苏期分别取2头迅速称重, 冷冻待用。同时取未处理试虫2头, 称重后于80 °C烘箱中烘1 h再称重, 重复3次。算出试虫的干湿重之比, 用以计算酶活力。

酶液提取 取预先处理好的试虫, 加入适量0.05 mol/L pH 7.0的磷酸缓冲液, 冰浴匀浆, 匀浆液于0~4 °C下以8 000 r/min离心10 min, 上清液即为粗酶液, 贮于4 °C下待用。

SOD活力测定 SOD活力测定采用邻苯三酚自氧化法进行^[10]。保持邻苯三酚自氧化速率为

^{*} [收稿日期] 2003-11-10

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A 04); 国家自然科学基金资助项目(39970506); 国家“863”项目(2001AA 246016)

[作者简介] 马志卿(1975-), 男, 新疆奇台人, 讲师, 博士, 主要从事农药毒理学和生物农药研究。E-mail: mazhiqing@cnjpm.com

0.060/min。然后,准备好干净的 2 组小试管,一组中加入水和邻苯三酚 2.2 mL,其比例依据邻苯三酚自氧化速率测定结果进行调整;另一组加 2.25 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)和 50 μ L 酶液,将对应两试管中的试剂混匀,同时开始计时,每一混合间隔时间为 5 s,室温下反应 4 min 后,加一滴 10 mol/L 盐酸中止反应,每一中止反应的间隔为 5 s,以保证每一管反应时间为 4 min,然后于 420 nm 下比色。以下式计算 SOD 的活力: SOD 活力(OD_{420}/g) = [(OD1- OD2) $\times$ 100]/(OD1 $\times$ 0.5 $\times$ $m_{\mp}$) (OD1 为邻苯三酚 2 min 吸光度,OD2 为样品所测吸光度; $m_{\mp}$ 为试虫干重)。一个酶活单位(U)相当于引起 4.5 mL 反应液达到 50% 抑制所需的酶量。酶活力以 U/g 表示。

CAT 活力测定 CAT 活力测定按文献[2]的方法进行。在 5 mL 反应液中含 50 mmol/L 磷酸缓

冲液(pH 7), 8 mmol/L H_2O_2 及 100 μ L 酶液,于 30 s 下反应 1 min,加 2 mL 体积分数 10% H_2SO_4 终止反应。再以 2 mmol/L KMnO_4 滴定剩余 H_2O_2 ,根据 H_2O_2 的消失量计算 CAT 活性。酶活力以每克试虫干重所消耗的 H_2O_2 的量表示。

POD 活力测定 采用愈创木酚比色法^[11]。3 mL 反应体系中含 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0), 30 mmol/L 愈创木酚, 26 mmol/L H_2O_2 和 50 μ L 酶液,反应 5 min 后,于 470 nm 比色。酶活力以 OD_{470} 每克试虫干重表示。

2 结果与分析

2.1 松油烯-4-醇对粘虫 SOD 活力的影响

以松油烯-4-醇处理粘虫 5 龄幼虫后,测定不同中毒期试虫体内 SOD 活力的变化,结果见表 1。

表 1 松油烯-4-醇对粘虫 5 龄幼虫 SOD 活力的影响

Table 1 The effect of terpinen-4-ol on SOD activities in 5th instar larvae of amywom

处理 Treatment	SOD 活力/(U $\cdot$ g ⁻¹) SOD activity	处理/对照 Tr/CK
空白对照 CK	459 $\pm$ 51 d D	1.00
兴奋期 Excitation stage	1 395 $\pm$ 78 a A	3.04
痉挛期 Convulsion stage	1 157 $\pm$ 29 b AB	2.52
麻痹期 Paralysis stage	953 $\pm$ 59 c BC	2.08
复苏期 Recovery stage	749 $\pm$ 78 c C	1.63

注:试虫的平均干重($m_{\mp}$)为 0.024 8 g/虫;表中数据为 3 次重复的平均值;数据后标相同大(小)写字母表示在 0.01(0.05)水平上酶活力差异不显著,不同者表示差异显著;下同。

Note: The average dry weight of insects tested is 0.024 8 g/larvae; Data are given as means $\pm$ standard errors from 3 duplications; Data in a column with the same small (capital) letters are not significantly different at $P_{0.05}$ ($P_{0.01}$) by Duncan's multiple range test, respectively; It is the same in the following tables

由表 1 可知,用松油烯-4-醇处理后, SOD 被明显激活,不同中毒期试虫酶活力均极显著高于对照。其中在兴奋期 SOD 活力最大,为 1 395 U/g,是对照的 3.04 倍;随后逐步下降,在痉挛期、麻痹期和复苏期,酶活力分别为对照的 2.52、2.08 和 1.63 倍。可见松油烯-4-醇对试虫 SOD 活力有极显著影响。

表 2 松油烯-4-醇对粘虫 5 龄幼虫 CAT 活力的影响

Table 2 The effect of terpinen-4-ol on CAT activities in 5th instar larvae of amywom

处理 Treatment	CAT 活力/(μ g $\cdot$ g ⁻¹) CAT activity	处理/对照 Tr/CK
空白对照 CK	14 261 $\pm$ 381 a A	1.00
兴奋期 Excitation stage	13 432 $\pm$ 364 ab A	0.94
痉挛期 Convulsion stage	14 272 $\pm$ 481 a A	1.00
麻痹期 Paralysis stage	11 176 $\pm$ 567 c B	0.78
复苏期 Recovery stage	13 117 $\pm$ 552 b A	0.92

注:试虫的平均干重($m_{\mp}$)为 0.054 g/虫。

Note: The average dry weight of insects tested is 0.054 g/larvae

2.3 POD 活力测定结果

以松油烯-4-醇处理粘虫 5 龄幼虫后,测定试虫

2.2 松油烯-4-醇对 CAT 活力的影响

松油烯-4-醇对粘虫 CAT 的活力也有一定影响。由表 2 知,在兴奋期和痉挛期, CAT 活力变化不大,与对照无明显差异;在麻痹期, CAT 被明显抑制,活力仅为对照的 78%;在复苏期,酶活力有所升高,与麻痹期差异极显著,与对照差异显著。

体内 POD 活力的变化,结果见表 3。表 3 表明,松油烯-4-醇对试虫 POD 的影响较为复杂。在兴奋期,

POD 被抑制, 酶活力为对照的 81%, 二者差异极显著; 在痉挛期, 酶活力有所恢复, 但仍与对照差异显著; 在麻痹期, POD 被严重抑制, 酶活力仅为对照的 65%; 而在复苏期, 酶活力又升高, 为对照的 90%, 与之差异显著, 且与麻痹期差异极显著。

表 3 松油烯-4-醇对粘虫 5 龄幼虫 POD 活力的影响

Table 3 The effect of terpinen-4-ol on POD activities in 5th instar larvae of ammywom

处理 Treatment	POD 活力/(OD ₄₇₀ · g ⁻¹) POD activity	处理/对照 Tr/CK
空白对照 CK	0.976 ± 0.067 a A	1.00
兴奋期 Excitation stage	0.795 ± 0.070 c B	0.81
痉挛期 Convulsion stage	0.837 ± 0.021 bc B	0.86
麻痹期 Paralysis stage	0.635 ± 0.052 d C	0.65
复苏期 Recovery stage	0.879 ± 0.015 bc AB	0.90

注: 试虫的平均干重(m)为 0.0478 g/虫。
Note: The average dry weight of insects tested is 0.0478 g/larvae

3 讨 论

3.1 SOD 活力增加是松油烯-4-醇的诱导反应

生物在高温、低温、缺氧、盐害、杀虫剂、干旱等逆境条件下, 体内超氧自由基(O_2^-)、单线态氧(1O_2)、过氧化氢(H_2O_2)和氢氧自由基($HO\cdot$)等活性增加, 超氧自由基(O_2^-)的增加可以诱导 SOD 活性增加, 催化超氧自由基的歧化反应, 生成的 H_2O_2 又可被生物体内的过氧化物酶和过氧化氢酶清除, 保护 SOD 活性^[12]。李周直等^[2]发现, 利用溴氰菊酯烟剂处理菜粉蝶、褐刺蛾和褐边绿刺蛾后, 虫体中 SOD、CAT 及 POD 活力均高于正常虫体, 表明机体能提高其保护酶活性, 以适应外界毒害的影响。白背飞虱取食水稻中抗品种 N22 和高抗品种 Ptb33 时, 虫体内 SOD 和 CAT 活性明显增加^[13]。本研究结果表明, 以松油烯-4-醇处理粘虫 5 龄幼虫后, 在兴奋期 SOD 被明显激活, 酶活力为对照的 3.04 倍。SOD 活力增加可能是松油烯-4-醇的诱导反应, 即松油烯-4-醇诱发试虫体内超氧自由基浓度升高, 而超氧自由基浓度升高又激活了虫体内的 SOD 酶原, 变为有活性的 SOD^[14], SOD 催化超氧自由基发生歧化反应以减轻其造成的生物破坏。松油烯-4-醇可抑制 Na^+ , K^+ -ATPase^[9], 当该酶被抑制后引起试虫体内神经传导紊乱, 进而造成试虫的生理生化代谢紊乱, 随着中毒的加剧, 试虫体内 SOD 活力逐渐下降, 但仍高于对照, 说明这种诱导反应是连续的。

3.2 中毒试虫的死亡和复苏可能与 CAT 和 POD 的活力变化有关

在生物体内 SOD 可清除超氧自由基(O_2^-)而形成 H_2O_2 , H_2O_2 能与 O_2^- 形成毒性更强的氢氧自由基($HO\cdot$), 但过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)具有分解 H_2O_2 的作用, 所以正常情况下, 细

胞内自由基的产生与清除是 SOD、CAT 和 POD 协同作用的结果, 使自由基维持在一个较低水平, 从而防止其毒害, 一旦这种平衡受到破坏, 就可能产生伤害作用^[1, 2]。蒋志胜等^[15]研究认为, α -三嗪吩(α -T)对库蚊体内保护酶活性的抑制是其造成试虫正常生理功能失衡, 直至死亡的主要原因。醚菊酯可引起马尾松毛虫 5 龄幼虫体内 CAT 和 POD 活力的变化, 在临近死亡时, CAT 和 POD 活力均低于对照^[16]。以磷化氢(PH_3)处理的谷象, 其 SOD、CAT 和 POD 均会发生变化而导致 H_2O_2 的积累和随后氢氧自由基($HO\cdot$)的产生, 这些氧自由基的积累与昆虫死亡有关^[7]。

本研究结果表明, 在兴奋期和痉挛期, CAT 活性变化不大, POD 被稍微抑制; 但在麻痹期, CAT 和 POD 均被明显抑制, CAT 的活力仅为对照的 78.0%, POD 的活力仅为对照的 65.0%。而在这 3 个时期, SOD 的活力均极显著地高于对照, SOD 被激活后可不断与超氧自由基(O_2^-)发生歧化反应而形成 H_2O_2 , 但 CAT 和 POD 的活力因被抑制而对 H_2O_2 的分解能力降低, 大量的 H_2O_2 与 O_2^- 形成毒性更强的 $HO\cdot$, 从而对生物膜造成严重损害。同时由于 Na^+ , K^+ -ATPase 也被严重抑制, 神经传导紊乱, 造成试虫生理生化代谢紊乱, 引起试虫机体衰竭、麻痹。虽然部分被麻痹的试虫在一段时间后又可复苏, 但最终仍然死亡。但是在复苏期, CAT 和 POD 的活力有所恢复, 分别为对照的 92.0% 和 90.0%, 较麻痹期的活力高得多, 也说明试虫中毒症状的减轻或许与 CAT 和 POD 的活力恢复有关, CAT 和 POD 的活力恢复可增强对 H_2O_2 的分解而减轻其对生物体的损害。这种变化更充分地说明, 试虫死亡与 SOD 活力增大及 CAT 和 POD 活力降低有关。

当然, 杀虫化合物在昆虫体内的反应及昆虫对其的代谢过程均非常复杂, 仅测定保护酶系统的变化难以全面阐述其作用机理及复苏机理, 关于松油

烯-4-醇对粘虫的杀虫作用机理及其在虫体内的代谢过程尚需深入研究。

[参考文献]

- [1] Fridovich I Oxygen is toxic[J]. *Bioscience*, 1977, 27(7): 462- 467.
- [2] 李周直, 沈惠娟, 蒋巧根, 等. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究[J]. *昆虫学报*, 1994, 37(4): 399- 403.
- [3] Grubor Lajsic G, Block W, Jovanovic A, et al Antioxidant enzymes in larva of the Antarctic fly, *Belgica antarctica*[J]. *Cryo Letters*, 1996, 17(1): 39- 42.
- [4] Grubor Lajsic G, Block W, Telesmanic M, et al Effect of cold acclimation of the antioxidant defense system of two larval *Lepidoptera* (Noctuidae) [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1997, 36(1): 1- 10.
- [5] Aucoin, Richard R, Bernard J R, et al Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phototoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous *Lepidoptera*[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1991, 16(2): 139- 152.
- [6] 刘进兰, 吴进才, 袁树忠, 等. 经除草剂处理的水稻对褐飞虱体内几种酶及水稻受褐飞虱危害程度的影响[J]. *中国水稻科学*, 2001, 15(4): 303- 308.
- [7] Bolter, Caroline J, William C. The effect of phosphine treatment on SOD, CAT and POD in the grain weevil, *Sitophilus granarius*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1990, 36(1): 52- 60.
- [8] 陈根强. 砂地柏精油主成分松-4-醇杀虫作用研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学植保学院, 2001.
- [9] 马志卿. 不同类杀虫药剂的致毒症状与作用机理关系研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学植保学院, 2002.
- [10] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴, 等. 植物生理实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990.
- [11] Simon L M, Fatrai Z, Jonas D E, et al Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*[J]. *Biochemistry and Physiology*, 1974, 166: 387- 392.
- [12] 邹宇晓. 昆虫应激代谢产物——热休克蛋白及保护酶研究概况[J]. *广东蚕业*, 2000, 34(1): 55- 58.
- [13] 陈建明, 俞晓平, 吕仲贤, 等. 白背飞虱取食抗虫品种过程中体内保护酶和自由基的变化[J]. *华东昆虫学报*, 2002, 11(2): 41- 45.
- [14] McCord J M, Beauchamp C O, Goscin S, et al Superoxide and superoxide dismutase[A]. King T E, Mason H S, Morrison M. *Oxidative and Related System (Proceedings of the 2nd Insect Symposium)* [C]. Baltimore: University Park Press, 1973: 51.
- [15] 蒋志胜, 尚稚珍, 万树青, 等. 光活化杀虫剂 α -三嗪吩的电子自旋共振分析及其对库蚊保护酶系统活性的影响[J]. *昆虫学报*, 2003, 46(1): 22- 26.
- [16] 陈尚文. 马尾松毛虫过氧化物酶及过氧化物酶与耐药性的关系[J]. *昆虫学报*, 2001, 44(1): 9- 14.

Effect of terpinen-4-ol on the activities of endogenous enzymes of protective system in armyworm (*Mythimna separata* Walker)

MA Zhi-qing¹, YAN Rui-li¹, CHEN Gen-qiang¹, LI Ximei², ZHANG Xing¹

(1 Bioinsecticidal Pesticide Research and Service Center, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Bureau of Shaanxi Taibaishan National Natural Reserves, Meixian, Shaanxi 722300, China)

Abstract: The effects of terpinen-4-ol, a main insecticidal composition in essential oil of *Sabina vulgaris* Ant, on activities of endogenous enzymes of protective system in 5th instar larvae of armyworm (*Mythimna separata* Walker) were studied in this paper. The result indicated that SOD was activated by terpinen-4-ol, SOD activities in all poisoning stages were higher than that of the control. In excitation stage, the activity of SOD was maximal, it was 3.04 times of that of the control. CAT was inhibited by terpinen-4-ol. The CAT activities were 78% and 92% of the control in paralysis stage and recovering stage. POD was also inhibited by terpinen-4-ol. The POD activities were respectively 0.81, 0.86, 0.65 and 0.90 times of that of control in excitation stage, convulsing stage, paralysis stage and recovering stage. It was thought that the recovering of insects paralysed was related to the change of activities of POD and CAT.

Key words: terpinen-4-ol; armyworm (*Mythimna separata* Walker); SOD; CAT; POD