

亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ对亚洲玉米螟EAG的影响

谢建军, 钟国华, 简美玲, 徐齐云, 刘萱清, 胡美英

(华南农业大学 资源环境学院 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

[摘要] 以闹羊花素-Ⅲ点滴亚洲玉米螟成虫, 确定其亚致死剂量为0.02 μg/头; 用该剂量闹羊花素-Ⅲ点滴亚洲玉米螟成虫后, 离体检测其触角电位(EAG)反应值。结果表明, 药剂处理的亚洲玉米螟成虫与未用药剂处理的正常试虫相比, EAG值增高, EAG反应有向增高方向漂移的现象, 且随叶醇浓度增高EAG反应漂移越明显。

[关键词] 闹羊花素-Ⅲ; 亚致死剂量; 亚洲玉米螟; 触角电位反应

[中图分类号] Q965.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)03-0103-05

杀虫剂的亚致死效应是多种多样的, 在此剂量下虽然不能立即杀死害虫, 但可以通过干扰雌雄间的化学通讯影响其种群的繁殖数量以及害虫的多种器官和系统的功能, 从而干扰其繁殖、寻找寄主、配偶、产卵场所、栖息场所、躲避天敌等正常行为^[1,2], 可以起到间接控制害虫的数量、减少杀虫剂用量、保护环境和天敌等作用, 对制定农田害虫的管理与防治策略也具有重要的指导意义^[3]。因此, 研究杀虫剂的亚致死剂量效应是十分必要和有实践意义的。

在生态系统中, 昆虫与周围环境有着密切的信息联系, 利用其感觉器官感受外界特定的化学与物理信号, 再做出相应的反应。灵敏的嗅觉对于昆虫的正常生存和适应环境非常重要。昆虫的触角是其发挥嗅觉功能重要的器官, 在寻找寄主、配偶、产卵场所等化学通讯行为中具有重大意义^[4-8]。触角电位(electroantennogram EAG)是昆虫触角上许多嗅觉感受器对气味刺激所产生的总动作电位, 其电位强弱反应了外界气味刺激活性的高低, 是研究昆虫周缘神经系统电生理的一种重要方法。因此, 研究亚致死剂量杀虫剂对昆虫触角电位的影响, 了解亚致死效应与化学通讯系统的关系, 对于深入探讨亚致死效应具有重要作用。

目前, 已从植物中分离得到了4万多种植物源活性物质, 包括植物源毒素、植物内源激素、防卫素、抗生素、信息素类等, 已经商品化的有除虫菊素、鱼藤、烟碱、印楝素、川楝素等多种植物源农药。这些植

物源农药具有高效、低毒、低残留, 对环境安全等特点, 已经广泛应用于蔬菜、水果、茶叶、中草药等经济作物生产中, 并取得了显著的经济、生态、社会效益。而且植物源农药比化学合成农药的作用方式更多, 表现对害虫毒杀、忌避、拒食、产卵忌避、抑制种群形成、引诱、麻痹、抑制生长发育等多种活性^[9,10]。但有关亚致死剂量植物源杀虫剂生物效应的研究还未见报道。闹羊花素-Ⅲ(rhodojaponin-Ⅲ)是源自杜鹃花科(Ericaceae)的一种二萜四环类化合物, 对多种农业害虫均有一定的生物活性, 且作用方式多样, 具有拒食、毒杀、生长发育抑制和产卵忌避等作用^[11]。本研究以闹羊花素-Ⅲ为代表, 用亚致死剂量处理亚洲玉米螟成虫, 对其触角电位反应进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要仪器、试剂和材料

1.1.1 主要仪器 触角电位仪, SYNTECH IDAC-Ⅲ 232(德国制造); 记录分析软件, 用GC-EAD软件Syntech 06进行信号的采集和分析。

1.1.2 供试化合物及其他试剂 98%闹羊花素-Ⅲ, 由华南农业大学资源环境学院昆虫毒理研究室胡美英教授提供; 98%溴氰菊酯, 购自南京红太阳集团公司; 99%叶醇(顺式-2-己烯醇), 购自广州市道福特香精香料有限公司; 其他常规试剂液体石蜡、无水乙醇、正己烷等均为市售分析纯。

1.1.3 供试虫源 亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)

[收稿日期] 2005-07-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30270886)

[作者简介] 谢建军(1972-), 男, 河南宝丰人, 在读博士, 主要从事天然源农药研究。

[通讯作者] 胡美英(1954-), 女, 广东兴宁人, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫毒理学及天然源农药研究。
E-mail: humy@scau.edu.cn

Gueneé)成虫,在实验室内以半人工饲料饲养,选取羽化正常、健康、能正常飞行的4种类型雌雄成虫(未交配的雌雄蛾和已交配的雌雄蛾)用于试验。

1.2 方法

1.2.1 闹羊花素-Ⅲ对亚洲玉米螟成虫亚致死剂量的确定 闹羊花素-Ⅲ用丙酮配成20,200,2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液,溴氰菊酯用丙酮配成20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液,用微量点滴仪分别点滴1 μL /头于亚洲玉米螟成虫胸部背板,对照点滴1 μL /头丙酮。待丙酮挥发完后,接入长 $\times$ 直径为20 cm $\times$ 9 cm的产卵盒中,放入养虫室内,在温度(27 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光照/黑暗为12/12 h、相对湿度75%条件下饲养。产卵盒中放1块湿润的棉球,供成虫补充水分。每处理重复3次,每重复至少15头虫。于处理后24,48,72,100 h统计试虫的死亡数,计算死亡率。闹羊花素-Ⅲ对亚洲玉米螟成虫亚致死剂量的确定参考文献[3,12]的标准。

1.2.2 触角电位试验中亚洲玉米螟成虫的处理方法 亚洲玉米螟成虫对4种溶剂及叶醇的触角电位反应试验,分别选用4种不同类型试虫(未交配的雌雄蛾和已交配的雌雄蛾)未用药处理正常亚洲玉米螟成虫进行。亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ处理试虫的触角电位反应试验中,用亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ点滴4种不同类型亚洲玉米螟成虫,点滴方法同1.2.1,以同样量丙酮处理为对照,24 h后分别用于触角电位测试。

1.2.3 触角电位反应测试方法 取亚洲玉米螟成虫,用眼科剪沿头部一根触角基部剪下,另一端剪去少许,使供试触角长度为7~9 mm,然后用导电胶将其两端分别粘在参考电极和记录电极上。测试气流由真空泵送出,试验时开启气流分配仪,产生两股气流吹在离体触角上,一股为刺激气流,由气体吹过载有刺激样品的样品管后形成;另一股为净化气体的连续气流,是空气过滤、加湿后直接吹到触角上的

气流。连续气流端口与触角垂直,相距约1.5 cm。刺激气流的气流量为30 mL/min,连续气流的气流量为40 mL/min,两股气体流速为100 mL/s。试验开始后,先用连续气流吹离体供试触角几分钟,使触角适应连续气流的刺激,电位不再发生变化,一般平衡在基线处即可进行供试化合物的测试。在长宽为40 mm $\times$ 5 mm的滤纸条上滴加供测试样品溶液10 μL ,每个样品刺激300 ms,刺激间隔60 s。不同化合物刺激中间用净化气体吹1~2 min,以减少气味分子在触角附近的堆积,防止出现适应现象,让触角尽快恢复。一般而言,每根触角可以连续用于试验1 h以上。每组设6次处理,重复3次^[13]。

触角电位相对值=测试样品反应值/对照样品反应值^[11],此处对照样品指测试样品的溶剂。数据分析采用Excel、SAS进行。

2 结果与分析

2.1 闹羊花素-Ⅲ对亚洲玉米螟成虫的亚致死剂量

闹羊花素-Ⅲ点滴处理亚洲玉米螟成虫,结果见表1。由表1可见,闹羊花素-Ⅲ用量为0.02 μg /头时,亚洲玉米螟成虫24 h校正死亡率为0,100 h校正死亡率为5.14%;闹羊花素-Ⅲ用量为0.2 μg /头时,亚洲玉米螟成虫24 h校正死亡率大于5%;闹羊花素-Ⅲ用量为2 μg /头时,亚洲玉米螟成虫100 h校正死亡率达到87.13%。参考杜家纬^[12]亚致死剂量确定方法,闹羊花素-Ⅲ对亚洲玉米螟成虫的点滴亚致死剂量确定为0.02 μg /头,对照药剂溴氰菊酯质量浓度与文献[3]报道的亚致死剂量有一些偏差。同时观察发现,闹羊花素-Ⅲ点滴处理亚洲玉米螟成虫后,成虫躁动不安,四处爬走,振翅,出现典型的神经毒剂症状,与对照成虫在白天几乎静止不动形成鲜明对照。

表1 闹羊花素-Ⅲ点滴亚洲玉米螟成虫的死亡率

Table 1 Mortalities of *Ostrinia furnacalis* adults topically applications with rhodojaponin-Ⅲ

处理 Treatment		校正死亡率 $\pm$ S. E. Revised mortality			
药剂 Pesticide	用量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{头}^{-1}$) Dosage	24 h	48 h	72 h	100 h
闹羊花素-Ⅲ Rhodojaponin-Ⅲ	0.02	0	2.78 $\pm$ 1.61	3.32 $\pm$ 0.73	5.14 $\pm$ 0.45
	0.2	5.16 $\pm$ 2.98	8.19 $\pm$ 2.12	15.34 $\pm$ 2.82	17.35 $\pm$ 2.70
	2	52.60 $\pm$ 7.91	59.79 $\pm$ 3.14	85.30 $\pm$ 3.54	87.13 $\pm$ 5.13
溴氰菊酯 Deltamethrin	0.02	5.34 $\pm$ 3.08	10.9 $\pm$ 3.01	12.97 $\pm$ 0.636	17.33 $\pm$ 1.70

2.2 亚洲玉米螟成虫对 4 种溶剂及叶醇的触角电位反应

无水乙醇、蒸馏水、液体石蜡和正己烷 4 种溶剂对亚洲玉米螟成虫的触角电位反应见图 1。由图 1 可见,4 种溶剂中亚洲玉米螟成虫对蒸馏水的触角电位反应值最小,且 4 种类型试虫的触角电位反应都比较一致,而叶醇在水中的溶解能力又极强。因此,选择蒸馏水作为叶醇的溶剂。

标准化合物叶醇对绝大多数昆虫的触角电位反应具有较强的刺激活性,被国际上选用为测试触角电位的标样。由图 2 可见,亚洲玉米螟成虫对叶醇的触角电位反应呈现明显的剂量效应关系,4 种不同类型亚洲玉米螟成虫触角电位反应值随叶醇质量浓

度的升高而增高,反应趋势一致。因此,选择叶醇作为刺激源气味化合物。

2.3 亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ对亚洲玉米螟成虫的触角电位反应

亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ点滴 4 种类型亚洲玉米螟成虫后 24 h,测定其触角电位反应值,结果见表 2,3。由表 2,3 可见,闹羊花素-Ⅲ处理的亚洲玉米螟成虫的触角电位反应值均较未处理的正常试虫高,且触角电位反应值有向增高方向漂移的现象。随着叶醇质量浓度增高,药剂处理试虫的触角电位反应漂移越明显,触角电位反应值与未处理正常试虫的差异显著。

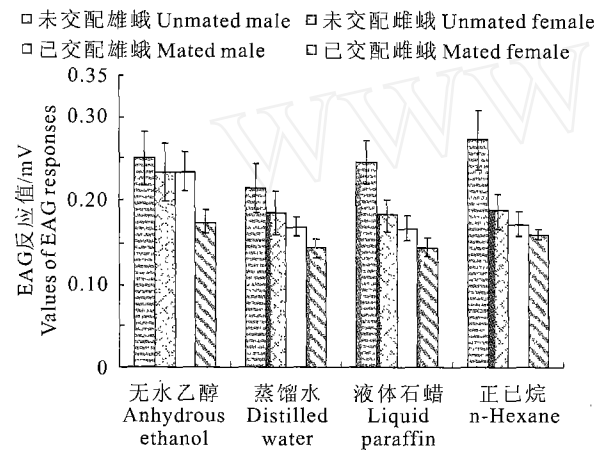


图 1 亚洲玉米螟成虫对 4 种溶剂的触角电位反应

Fig.1 EAG responses of *Ostrinia furnacalis* adults to four solvents

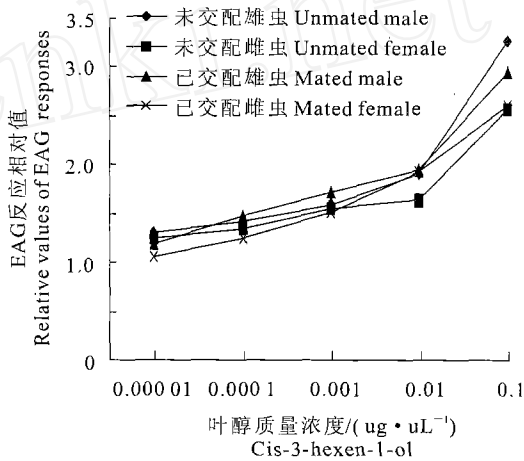


图 2 亚洲玉米螟成虫对标准化合物叶醇的触角电位反应-剂量曲线

Fig.2 EAG response curves of *Ostrinia furnacalis* adults to cis-3-hexen-1-ol

表 2 亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ对未交配亚洲玉米螟成虫的触角电位反应值

Table 2 EAG responses of unmated *Ostrinia furnacalis* adults topically applications with sub-lethal rhodojaponin-Ⅲ

处理/ ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) Treatment		雄虫 Male		雌虫 Female	
		药剂处理 Treated	未处理 Untreated	药剂处理 Treated	未处理 Untreated
叶醇 Cis-3-hexen-1-ol	1×10^{-5}	0.246±0.008 dA	0.207±0.014 cB	0.225±0.016 dB	0.222±0.012 cJB
	1×10^{-1}	0.263±0.022 dA	0.230±0.014 cA	0.262±0.022 dA	0.262±0.026 cA
	1×10^{-3}	0.399±0.022 cA	0.306±0.029 cB	0.431±0.032 cA	0.289±0.014 cB
	1×10^{-2}	0.912±0.066 bB	0.644±0.072 bC	1.099±0.065 bA	0.597±0.033 bC
	1×10^{-1}	2.656±0.144 aA	1.868±0.239 aB	1.948±0.068 aB	1.264±0.079 aC
蒸馏水 Distilled water		0.228±0.019 dA	0.196±0.018 cB	0.209±0.015 dAB	0.204±0.011 deAB

注:小写字母为同一列比较,大写字母为同一行比较,数据后标相同字母者表示在 0.05 水平上差异不显著。下表同。

Note: Data with the same letter represents the values that are not different statistically ($P=0.05$,DMRT); Small letters mean the compare of the same line, and capital letters mean the compare of the same row.

表3 亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ对已交配亚洲玉米螟成虫的触角电位反应值

Table 3 EAG responses of mated *Ostrinia furnacalis* adults topically applications with sub-lethal rhodajaponin-Ⅲ mV

处理/($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) Treatment	雄虫 Male		雌虫 Female	
	药剂处理 Treated	未处理 Untreated	药剂处理 Treated	未处理 Untreated
叶醇 Cis-3-hexen-1-ol	1×10^{-5}	$0.540 \pm 0.011 \text{ dA}$	$0.311 \pm 0.014 \text{ cC}$	$0.391 \pm 0.033 \text{ dB}$
	1×10^{-4}	$0.535 \pm 0.022 \text{ dA}$	$0.323 \pm 0.021 \text{ cC}$	$0.432 \pm 0.046 \text{ dB}$
	1×10^{-3}	$0.674 \pm 0.049 \text{ cA}$	$0.411 \pm 0.013 \text{ cC}$	$0.531 \pm 0.081 \text{ cB}$
	1×10^{-2}	$1.212 \pm 0.051 \text{ bA}$	$1.114 \pm 0.104 \text{ bA}$	$1.013 \pm 0.155 \text{ bA}$
	1×10^{-1}	$4.134 \pm 0.158 \text{ aA}$	$2.577 \pm 0.103 \text{ aB}$	$1.869 \pm 0.286 \text{ aC}$
蒸馏水 Distilled water		$0.496 \pm 0.034 \text{ dA}$		$0.380 \pm 0.026 \text{ dB}$

3 讨论

亚致死剂量杀虫剂处理昆虫后,对昆虫的取食、生长发育、交配、繁殖和产卵行为以及卵孵化率等产生不良影响,其存活个体及其后代的生物学特性也可能发生显著变化^[1]。昆虫触角上的化学感受器将感受到的信息素分子通过复杂的周缘神经系统产生电生理反应,并通过轴突将电信号传入中枢神经系统。在这个过程中,电信号具有特征性的振幅和频率,如果电信号发生改变,将会最终导致昆虫行为的改变^[4]。亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ处理亚洲玉米螟成虫后,其触角电位反应发生了严重漂移,表明药剂处理后触角的电生理反应与正常试虫不同,药剂处理的触角在感受外界化学信号时产生了与正常试虫不同的信号。这很可能引起成虫行为反应异常,进而影响其在寻找寄主、配偶、栖息场所、躲避天敌等时的正常行为,起到控制害虫的作用。至于亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ对亚洲玉米螟成虫具体行为反应的影响与干扰,仍需进一步深入系统的研究。

Masutani等^[15]研究了34种木藜芦烷毒素衍生物对青蛙骨骼肌的构效关系,认为这类毒素可能是增加 Na^+ 通透性,从而影响神经冲动的传导。闹羊花素-Ⅲ属于木藜芦烷毒素,亚致死剂量闹羊花素-Ⅲ处理亚洲玉米螟成虫后,在离体触角电位反应上

出现向增高漂移的趋势,产生这种反应的内在分子机制可能是闹羊花素-Ⅲ处理后,导致亚洲玉米螟成虫体内信号传导系统发生变化,在神经细胞树突膜去极化,神经细胞进行信息整合和编码的过程中出现变化,最终表现为触角电位反应出现异常。闹羊花素-Ⅲ对亚洲玉米螟体内神经细胞轴突 Na^+ 通道、神经冲动以及信号传导系统的影响,还有待进一步深入研究。闹羊花素-Ⅲ的亚致死效应也是多方面的,深入研究其亚致死效应,对指导田间合理科学使用植物源杀虫剂、协调化学防治与生物防治的关系、丰富田间毒理学的内容等具有重要的参考价值。因此,相关工作也需要继续深入探讨。

目前,在有害生物综合防治体系中,有关农药的亚致死效应很少受到关注,常习惯性地增加用药量和施药次数,造成了严重的“3R”现象,而且造成食物农药污染严重,威胁着人类的身体健康。而具有亚致死生物效应的杀虫剂可以减少农药的使用量,减轻“3R”现象,有利于保护天敌,降低农药成本,对于无公害农产品生产具有重要实践意义。因此,有针对性地选出并应用一些具有亚致死剂量效应的农药,会更有利于对害虫的有效控制、环境安全、农产品的无公害生产及人类健康^[2]。有关亚致死剂量杀虫剂对害虫种群、生态环境的长期效应,也需要密切关注^[16]。

参考文献

- [1] 慕卫,刘峰,贾忠明,等.八种杀虫剂对韭菜迟眼蕈蚊发育和繁殖的亚致死效应[J].昆虫学报,2005,48(1):147-150.
- [2] 姜卫华,韩召军,张国华.氟虫腈对二化螟抗、感种群的亚致死效应[J].南京农业大学学报,2004,27(2):51-54.
- [3] 周弘春,杜家伟,黄勇平.溴氰菊酯对亚洲玉米螟雄蛾感受雌性信息素的影响[J].应用生态学报,2003,14(5):725-729.
- [4] 徐美娟,管致和.番茄植株中挥发性组分的鉴定及其对菜粉蝶(*Pieris rapae* L.)的触角电位活性[J].中国农业大学学报,1996,1(3):77-80.
- [5] Anderson P, Hansson B S, Löfqvist J. Plant-odour-specific receptor neurons on the antennae of female and male *Spodoptera littoralis*[J]. Physiological Entomology, 1995, 20: 189-198.
- [6] Giovanni C G, Kunze J, Andreas G, et al. Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system[J]. Behavioral Ecology, 2005, 16(1): 159-168.

- [7] 张建平,赵博光,吴宗汉,等.应用昆虫行为控制法治理害虫[J].南京林业大学学报,2000,24(3):84-88.
- [8] 钦俊德,王琛柱.论昆虫与植物的相互作用和进化的关系[J].昆虫学报,2001,44(3):360-365.
- [9] 罗都强,张 兴.植物源杀虫剂研究进展[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(增刊):94-99.
- [10] Leonard G C, Julius J M. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy[J]. Pest Management Science, 2000, 56: 651-676.
- [11] Zhong G H, Hu M Y, Weng Q F, et al. Laboratory and field evaluations of extracts from *Rhododendron molle* flowers as insect growth regulator to imported cabbage worm, *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae)[J]. J Appl Ent, 2001, 125: 563-569.
- [12] 杜家纬.植物-昆虫间的化学通讯及其行为控制[J].植物生理学报,2001,27(3):193-200.
- [13] 任自立,孙 庆,程振衡.亚洲玉米螟对性信息素的触角电位反应[J].昆虫学报,1983,26(3):250-255.
- [14] Deng J Y, Huang Y P, Wei H Y, et al. EAG and behavioral responses of *Helicoverpa armigera* males to volatiles from poplar leaves and their combinations with sex pheromone[J]. 浙江大学学报, 2004, 5(12): 1577-1582.
- [15] Masutani T, Seyuma I, Narahashi T, et al. Structure-activity relationship for grayanotoxin derivatives in frog skeletal muscle[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1981, 217(3): 812-829.
- [16] 王小艺.杀虫剂的亚致死效应[J].世界农药,2004,26(3):24-26.

Effects of sub-lethal rhodojaponin-Ⅲ on the electroantennogram to Asiatic corn borer (*Ostrinia furnacalis* Guenée)

XIE Jian-jun, ZHONG Guo-hua, JIAN Mei-ling,

XU Qi-yun, LIU Xuan-qing, HU Mei-ying

(Laboratory of Insect Toxicology, College of Resource and Environment,
South China Agriculture University, Guangdong, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The sub-lethal dose of rhodojaponin-Ⅲ against Asiatic corn borer adults was 0.02 μg per adult. The effects of sub-lethal rhodojaponin-Ⅲ on the electroantennogram (EAG) to Asiatic corn borer adults were studied *in vitro*. The EAG values of Asiatic corn borer adults treated topically with sub-lethal rhodojaponin-Ⅲ to cis-3-hexen-1-ol were higher than that of CK's, and the EAG values increased significantly with the increase of the cis-3-hexen-1-ol concentrations.

Key words: Rhodojaponin-Ⅲ; sub-lethal dosage; *Ostrinia furnacalis* Guenée; electroantennogram