取活性成分来制备商品杀虫剂满足生产需要。因此,对该植物的开发利用,也应与开发其它杀虫植物一样,必须选取其活性高、杀虫谱广、作用方式多样、作用机理与常规杀虫剂不同的成分为模板进行研究。如果能在这方面取得突破,则极有可能开发出一类新型的具有良好环境和谐性的理想杀虫剂,为治理害虫和保护环境发挥作用。

参 考 文 献

1 Ahmad V. U., Ali Z., Hussaini S. R., Iqbal F., Zahid M., Abbas M., Saba N. *Fitoterapia*, 1999, **70**: 443~445.

2 Damre A. S., Gokhale A. B., Phadke A. S., Kulkarni K. R., Saraf M. N. *Fitoterapia*, 2003, **74**: 257~261.

3 Gupta R. K., Krishnamurti M., Parthasarathi L. *Phytochemistry*, 1980, **19**(6): 1 264.

4 Venkata R. E., Ranga R. N. *Phytochemistry*, 1984, **23**(10): 2 339~2 342.

5 高红明, 王兆龙, 张彪, 吴晓霞. 江苏农业研究, 1999, **20**(4): 32~34.

6 陈立, 徐汉虹, 赵善欢. 天然产物研究与开发, 2000, **12**(6): 22~26.

7 陈立, 徐汉虹, 赵善欢. 华中农业大学学报, 2000, **19**(1): 12~14.

8 张国州, 徐汉虹, 王亚维. 青海大学学报(自然科学版), 2001, **19**(6): 1~3.

9 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社, 2002.

10 贝纳新, 高萍, 石承民, 田秀玲, 金亮. 沈阳农业大学学报(自然科学版), 2002, **33**(4): 309~314.

11 Pelhale M., Sattelle D. *Insect Physica*, 1982, **11**: 889~903.

12 Schoonhoven I. M. *Entomol. Exp. Appl.*, 1982, **31**: 57~69.

13 廖春燕, 刘秀琼. 华南农业大学学报, 1986, **7**(2): 43~46.

14 Chen Y. L., Wang Y. S., Lin Y. L., Munakata K., Ohta K. *Agriaul. Biol. Chem.*, 1978, **42**(12): 2 431~2 432.

15 Machocho A. K., Lwande W., Jondiko J. I., Moreka L. V. C., Hassanali A. *Intern. J. Pharmacognosy*, 1995, **33**(3): 222~227.

16 Were O., Munavu R. M., Lwande W., Nyandat E. *Fitoterapia*, 1990, **61**(4): 372.

17 Simmonds M. S. J., Blaney W. M., Delle Monache F., Bettolo G. B. *J. Chem. Ecol.*, 1990, **16**(2): 365~380.

18 Sinha B., Natu A. A., Nanavati D. D. *Phtochemistry*, 1982, **21**(6): 1 468~1 470.

19 Shankar M. B., Parikh J. R., Geetha M., Metha R. S., Saluja A. K. *J. Natur. Remed.*, 2005, **5**(2): 115~120.

磷化氢对赤拟谷盗成虫体内 CAT 和 SOD 活性的影响*

魏朝明 张琳琳 廉振民**

(陕西师范大学生命科学学院 西安 710062)

Effect of phosphine on the activities of CAT and SOD in *Tribolium castaneum*. WEI Zhao-Ming, ZHANG Lin-Lin, LIAN Zhen-Min** (*College of life Sciences, Shaanxi Normal University*, Xi'an 710062, China)

Abstract The adults of *Tribolium castaneum* (Herbst) were suffocated with phosphine to research the effect of phosphine on the activities of CAT and SOD. The results showed that after suffocating, the activities of CAT in four different geographical race of adults decreased. NGD1 decreased by 57% and NGD4 decreased by 19%. NGD2 and NGD3 decreased about 40%. The activities of SOD in four different geographical race of adults raised. The raised rang in NGD1 were the most and the raised rang in NGD2 were the least. The change scope of SOD and CAT is related with resistance to phosphine. The more resistance, the more changes.

Key words *Tribolium castaneum*, phosphine, SOD, CAT

*陕西省自然科学基金资助项目(2005C113)。

**通讯作者, E-mail: lianzhenmin@snnu.edu.cn

收稿日期: 2007-03-26, 修回日期: 2007-04-30, 接受日期 2007-05-25

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

摘 要 用赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst)成虫,研究 PH_3 对其体内超氧化物岐化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性的影响。结果表明 PH_3 熏蒸后,4 种不同地理种群的成虫体内,CAT 酶活性都有所降低。种群 NGD1 降低最多,接近 57%,而 NGD4 则只降低了 19%,NGD2 和 NGD3 的降低都在 40% 左右。不同地理种群的成虫体内,SOD 酶活性在熏蒸后都有所增加,种群 NGD1 增加幅度最大,NGD2 增加幅度最小。SOD 和 CAT 活性的变化幅度与成虫对 PH_3 产生的抗性有关,抗性越大,酶活性变化越大。

关键词 赤拟谷盗,PH_3,SOD,CAT

磷化氢(PH_3)是目前世界上普遍用于储粮保护的熏蒸剂。在发展中国家使用尤为广泛。它不仅对虫,鼠,螨,线虫等都有明显的毒杀作用,而且基本无残留,不影响谷物的品质和种子的活力,价格低廉,使用方便[1]。然而,由于长期连续使用,一些主要的储粮害虫(如赤拟谷盗)已经对 PH_3 产生了抗性[2~4]。PH_3 作为呼吸毒剂[5,6],一般认为其作用位点是呼吸链上电子传递和氧化还原酶系的末端氧化酶[7,8]。但是体内实验发现,PH_3 对细胞色素氧化酶活力几乎没有抑制作用[9]。Price 在 1980 年的研究表明,PH_3 引起昆虫体内的生物化学变化也并不完全类同于缺氧血症与氢氰酸[10]。因此 PH_3 对呼吸酶系的抑制作用可能比较复杂。

作者对赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst)在 PH_3 熏蒸前和熏蒸后体内 SOD 酶以及 CAT 酶活性的研究,试图从 SOD,CAT 的活性变化等性质上了解昆虫抗 PH_3 的机制。为抗性的防治或者延缓抗性的发展提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试虫来源

种群 NGD1 和 NGD2 来自四川,NGD3 来自广州,NGD4 来自澳大利亚。4 个品系均在本实验室饲养,其中 NGD1 对 PH_3 敏感,其它 3 个品系敏感性较低,或有中等程度的抗性。

1.2 主要试剂和仪器

SOD 试剂盒和 CAT 试剂盒(南京建成生物工程研究所),磷化铝(山东济宁化工厂生产),钼酸铵,氯化亚锡,无水亚硫酸钠,磷酸二氢钾,紫外可见分光光度计(TU-1800),旋涡震荡仪,低温低速离心机,恒温水浴锅。

1.3 磷化氢发生与浓度测定

采用曹阳等[11]的方法制备 PH_3。用磷化铝加 10% 稀硫酸(H_2SO_4),以排水集气法收集 PH_3。实验所用的 PH_3 气体采自当天发生的,并记录气体发生的室内温度。用鲁莉等[12]改进的钼蓝比色法测定集气瓶中 PH_3 的浓度。

1.4 磷化氢击倒成虫试验

取不同品系的赤拟谷盗各 100 头,置于 300 mL 的熏蒸瓶中,瓶口用橡胶塞密封,将一定体积的 PH_3 气体注入瓶内,使瓶内 PH_3 气体浓度为 2 mg/L。尔后观察供试成虫的反应,当有 50%的试虫出现麻痹反应时,记录所用的时间,每个种群重复 3 次。

1.5 酶原蛋白含量的测定

1.5.1 酶液的制备:分别挑选 4 个种群成虫未熏蒸的和熏蒸过的各 50 只,在液氮中研磨,将研磨的粉末放入 1.5 mL 的离心管中,加入试虫质量 9 倍体积预冷的 9%的生理盐水,使其溶解。将制备好的 10%的组织液用低温低速离心机在 3 000 r/min 离心 15 min。弃沉淀取上清,再将上清液按 1∶4 的比例稀释成 2%的酶液备用。

1.5.2 酶液中蛋白含量的测定:取试剂盒中考马斯亮蓝试剂按 1∶4 配制成应用液。向试管中分别加入 0.05 mL 的蒸馏水,蛋白质标准液,8 种不同的酶液,最后加 3 mL 的考马斯亮蓝显色剂。混匀,静置 10 min,于 595 nm,1 cm 光径,蒸馏水调零,测各管 OD 值。蛋白含量(g/L)=(测定管 OD-空白管 OD 值)/(标准管 OD 值-空白管 OD 值)×标准管蛋白浓度(0.615 g/L)。

1.6 酶活性的测定

1.6.1 SOD 活性的测定:按照试剂盒使用说明,分别加入试剂Ⅰ 1.0 mL,蒸馏水(对照管)或者酶液(测定管)100 μL,以及试剂Ⅱ,试剂

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

Ⅲ试剂4 各0.1 mL。用漩涡混匀器充分混匀，置于37 ℃恒温水浴锅中水浴40 min。加入2 mL显色剂，混匀，室温中放置10 min，于波长550 nm处，1 cm光径比色杯，蒸馏水调零，比色，记录各管的OD值。总SOD活力＝(对照管OD值－测定管OD值)/对照管OD值/50%×反应体系的稀释倍数/组织中蛋白含量。酶活力单位U/mgprot，U表示每mg组织蛋白在1 mL反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个SOD活力单位。

1.6.2 CAT活性的测定：按照测试盒使用说明，取2%的组织匀浆液0.02 mL，加入比色皿底部，将已经于25 ℃下预温好的，OD值在0.5～0.55之间的底物溶液3 mL用移液器快速冲入比色皿中，240 nm处立即测定吸光度，记下OD_1值，比色皿不要取出，1 min后立即再测1次吸光度，记下OD_2值。CAT活力＝$\log OD_1/OD_2$×2.303/60秒×组织蛋白稀释倍数×组织中蛋白含量。CAT酶活力单位U/gprot，U代表每g组织蛋白中CAT酶每s分解吸光度为0.50～0.55的底物中的CAT酶相对量。

2　实验结果

2.1　击倒试验的结果

不同种群的赤拟谷盗击倒试验结果由(表1)所示，我们将NGD1作为参考，其抗性系数为1。则其他3个品系中，NGD4的抗性系数最大，是NGD1的24倍，表现出中等抗药性水平。NGD2和NGD3的抗性系数分别为4.4和8，说明敏感性已经下降。4种品系成虫对PH_3的抗性顺序为NGD1＜NGD2＜NGD3＜NGD4。

表1　4个赤拟谷盗品系的KT_{50}值和抗性系数

品系	KT_{50}/min	抗性系数
NGD1	5	1
NGD2	22	4.4
NGD3	40	8
NGD4	120	24

注：赤拟谷盗的抗性系数＝其各品系的KT_{50}/NGD1的KT_{50}。

2.2　CAT酶活性测定结果

PH_3熏蒸前4个种群的CAT酶活性各不相同。其中NGD3酶活性最低，其余3个品系酶活性差距不大。熏蒸后，4个品系成虫CAT酶活性均有所降低。NGD1酶活性降低了57%，降低的幅度最大，而NGD2，NGD3，NGD4分别降低34%，45%，19%(图1)。

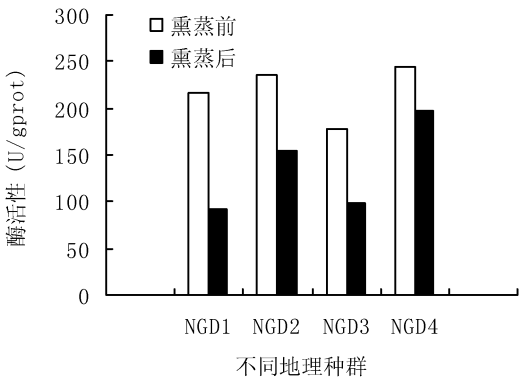


图1　熏蒸前后赤拟谷盗成虫体内CAT酶活性的变化

2.3　SOD酶活性测定结果

PH_3熏蒸前后，不同种群成虫体内SOD酶活性均有所增加，这与CAT酶活降低恰恰相反，但不同品系成虫增长的幅度不同。熏蒸前，NGD1的SOD酶活性最低，NGD4酶活性最大。熏蒸以后，虽然NGD1的SOD酶活性仍旧最低，但其增长率却为249%。NGD2，NGD3，NGD43个品系酶活性增长率也各不相同，分别为88%，237%，222%(见图2)。

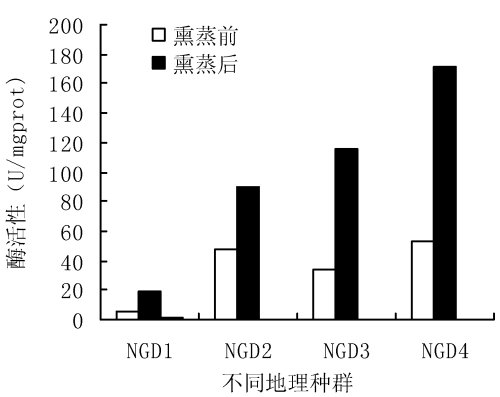


图2　熏蒸前后赤拟谷盗成虫体内SOD酶活性变化

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

3 讨论

生物在长时间的进化过程中逐渐形成了防御活性氧的防御系统，SOD，CAT 就是防御系统中重要的保护酶。SOD 是生物体中清除活性氧的关键酶，它能催化 O^{-2} 发生歧化反应生成 H_2O_2，而 CAT 则是把 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2[13]。在本试验中，我们用 PH_3 熏蒸 4 个不同地理种群的赤拟谷盗成虫，结果发现其 CAT 酶活性都降低，而 SOD 酶活性均有所增加，但不同种群的酶活性变化范围不同，这与前人用其他试验材料所得结果一致[14~16]。说明 PH_3 能显著抑制 CAT 酶的活性，且增加 SOD 酶活性，SOD 酶和 CAT 酶可能在 PH_3 对赤拟谷盗的解毒机制中起重要作用。

从(表 1)可知，4 个种群对 PH_3 的抗药性水平存在较大差异，但 4 个种群分别来自不同的地方。因此，这种差异不能排除不同地域的遗传背景造成的差异，对引发抗性的原因也可能不尽相同。同时由于长期在实验室饲养，温度湿度等条件的影响，不同品系繁殖的代数存在差异。随着繁殖代数的增加，其抗性程度会相应的减弱。

在本试验中，PH_3 处理后的赤拟谷盗 CAT 酶活性都有所降低，且随着抗性的增大，CAT 酶活性降低的幅度有所减小。但是 SOD 酶活的变化则刚好相反，随着抗性的增大，SOD 酶活性增加了，且随着抗性的增大，酶活性增加的幅度降低了。由此可见 CAT，SOD 酶活性的变化与赤拟谷盗对 PH_3 产生的抗性成反比，抗性大，则酶活性变化幅度小，抗性小，酶活性变化幅度大。可能是随着抗性的增强，生物体内的防御系统更加完善，对于相同程度的外界胁迫，反应程度也有所下降。NGD2 的抗性系数为 4.4，其 SOD 酶活才增加了 88%，其中也可能存在实验过程中温度和操作产生的误差。

PH_3 对昆虫体内过氧化氢酶的抑制，会导致过氧化氢积累，产生细胞毒性，因此可能成为 PH_3 毒性的一个重要原因[17]。虽然 PH_3 对中毒的人、鼠类、昆虫和螨类的过氧化氢酶均有抑制作用[18]，但在离体实验中，PH_3 并不能使储粮害虫匀浆中的过氧化氢酶活力明显降低[8]，只有相当高的浓度下，才能表现出抑制作用[17]，但本试验只是在特定时间固定 PH_3 浓度下进行，在不同的时间梯度和不同的浓度梯度下，PH_3 对 4 种试虫 SOD 酶和 CAT 酶的影响有没有相同的结论，则要做进一步的研究。

本研究进一步证明害虫对杀虫剂产生抗性原因之一，是由昆虫体内各种保护酶的活性发生变化引起的。如果连续使用会使保护酶的活性增大。所以我们在害虫防治中尽量减少使用同一种杀虫剂，而是要多种杀虫剂轮用或混用，防治抗性的发生和发展。

参 考 文 献

1 Taylor R. W. D. *Intern. Pest Cont.*, 1989, **31**(1): 4~10.
2 Taylor R. W. D. *Pestic Outlook*, 1991, **19**(2): 4~22.
3 国内贸易部成都粮科所，广东粮科所. 粮食储藏, 1995, **24**(5~6): 81~85.
4 Tyler P. S., Taylor R. W. K., Ress D. P. *Intern., Pest, Cont.*, 1983, **25**(1): 10~13.
5 Nakakita H., Satio T., Iyatomi K. *J. Stor. Prod. Res.* 1974, **10**(2): 87~92.
6 Price N. R. *Insect Biochem.*, 1980, **10**(1): 65~71.
7 Nakakita H., Katsumata Y., Ozama T. *J. Biochem.*, 1971, **69**(3): 589~593.
8 Kashi K. P., Chefurka W. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1976, **6**(4): 350~362.
9 Price N. R., Dance S. J. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1983, **76**(4): 81~277.
10 Price N. R. *Insect Biochem.*, 1980, **10**(2): 147~150.
11 曹阳，张建军. 粮食储藏, 2000, **29**(1): 10~16.
12 鲁莉，刘雅萍，徐萍. 职业与健康, 2004, **20**(11): 3~4.
13 刘井兰，于建飞，吴进才，印建莉，吴东浩，等. 昆虫知识, 2006, **43**(6): 752~756.
14 马志卿，颜瑞丽，陈根强，李喜梅，张兴，等. 西北农林科技大学学报, 2004, **32**(10): 85~88.
15 蒋继宏，吴薇，曹小迎，郭同斌，陈凤美，等. 南京林业大学学报, 2005, **29**(5): 91~93.
16 陈春刚，曹阳，柏志美. 粮食储藏, 2004, **32**(3): 12~17.
17 Price N. R., Mill K. A., Humphris L. A. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, **73**: 411~413.
18 Chugh S. N., Aroro V., Sharma A. *In. J. Med. Res.*, 1996, **104**(8): 190~193.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n