

## 虫酰肼和灭幼脲对锈色粒肩天牛氧化酶和解毒酶活性的影响

赵 艺, 徐华潮, 马 艳, 史黎央

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300)

**摘要:** 为探究虫酰肼和灭幼脲对锈色粒肩天牛 *Apriona swainsoni* (Hope) 生理机制的影响, 用经灭幼脲( $T_1$ )和虫酰肼( $T_2$ )处理的木屑饲喂锈色粒肩天牛幼虫, 测定天牛幼虫的过氧化氢酶(CAT), 超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽 S 转移酶(GSTs)和羧酸酯酶(CarE)活性, 每 12 h 取样, 持续 72 h。结果显示:  $T_1$  处理 CAT 活性先升高, 24 h 后降低;  $T_2$  处理 CAT 活性降低; 与对照组相比,  $T_1$  和  $T_2$  处理 SOD 活性、GSTs 活性显著增高( $P < 0.05$ ), CarE 活性则无明显差异。推测锈色粒肩天牛幼虫 GSTs 活性和虫体抗性的产生有关, GSTs 活性可能是天牛幼虫的抗性标识物。表 1 参 19

**关键词:** 森林保护学; 锈色粒肩天牛; 灭幼脲; 虫酰肼; 酶活性

中图分类号: S763.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2018)01-0174-04

## Oxidase and detoxifying enzyme activity of *Apriona swainsoni* (Hope) with diflubenzuron and flubenzuron

ZHAO Yi, XU Huachao, MA Yan, SHI Liyang

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** To research the influence of tebufenozide and chlorbenzuron on the physiological mechanism of *Apriona swainsoni* (Hope), *A. swainsoni* larvae were fed with sawdust treated by chlorbenzuron ( $T_1$ ) and tebufenozide ( $T_2$ ). These were then sampled to determine enzymatic activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S transferases (GSTs), and carboxylesterase (CarE) in larvae at intervals of 12 h to 72 h in succession. Results showed that after treatment with chlorbenzuron, the enzymatic activity of CAT increased first and then decreased 24 h later. Enzymatic activity of SOD maintained a high level. Also, after treatment by tebufenozide, the enzymatic activity of CAT decreased first with enzymatic activity of SOD being higher than the control. After treatment by two types of the pesticides, enzymatic activity of GSTs was higher than the control with no differences of CarE activity with the control. Therefore, enzymatic activity of GSTs in *A. swainsoni* was assumed to be associated with resistance generated in the larva and was likely to be a resistance marker of the larvae. [Ch, 1 tab. 19 ref.]

**Key words:** forest protection; *Apriona swainsoni* (Hope); chlorbenzuron; tebufenozide; enzymatic activity

锈色粒肩天牛 *Apriona swainsoni* 为鞘翅目 Coleoptera 天牛科 Cerambycidae 昆虫, 主要寄生于国槐 *Sophora japonica*, 云实 *Caesalpinia decapetala* 等豆科 Leguminosae 植物<sup>[1-3]</sup>, 是危害较为严重的蛀干害虫之一。灭幼脲(chlorbenzuron)是保幼激素的类似物<sup>[4-6]</sup>, 由咽侧体分泌, 对昆虫的生长、发育和生殖起着重要作用<sup>[7]</sup>。成虫饲喂灭幼脲后体质量减轻, 飞行能力减弱, 产卵量和孵化率下降, 寿命缩短等<sup>[8-9]</sup>, 近年来被广泛用于双翅目 Diptera 和鳞翅目 Lepidoptera 等害虫的防治, 在鞘翅目昆虫防治上也取得了一定成效<sup>[10]</sup>, 但在天牛幼虫的防治上研究较少。虫酰肼(flubenzuron)是昆虫蜕皮激素类似物, 常见蜕皮激素

收稿日期: 2017-01-17; 修回日期: 2017-04-07

基金项目: 浙江省林业科研成果推广项目(2016B03)

作者简介: 赵艺, 从事森林有害昆虫综合防治研究。E-mail: zyzjzbzc@163.com。通信作者: 徐华潮, 教授, 博士, 从事昆虫系统学及有害生物综合治理研究。E-mail: xhcinsect@zafu.edu.cn

类似物类杀虫剂有虫酰肼(RH5992)、米满(methoxyfenozide, RH2485)和氯虫酰肼(halofenozide, RH-0345)等3种,有报道称RH5992和RH2485只对鳞翅目昆虫有活性,RH-0345只对鞘翅目有活性<sup>[5]</sup>,但也有文献指出虫酰肼对双翅目摇蚊属*Chironomus*昆虫同样有效<sup>[11]</sup>。机体正常生理功能多是通过酶的调控实现的,抗氧化酶和解毒酶是机体内广泛存在的2类酶。McCord等<sup>[12]</sup>发现超氧化物歧化酶(SOD)可以使自由基发生歧化反应,谷胱甘肽S转移酶(GSTs)能催化还原型谷胱甘肽形成巯基氨基酸<sup>[13]</sup>,羧酸酯酶(CarE)可以催化羧酸酯生成酸和醇,从而降低细胞毒性,保护细胞膜。本研究以虫酰肼和灭幼脲处理后木屑喂饲锈色粒肩天牛幼虫,通过测定虫体内4种酶的变化,反映药物处理后天牛的生理状态,为天牛的防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用虫和材料

锈色粒肩天牛由上饶云实农业开发有限公司惠赠,为半生态饲养的3龄幼虫(龄期评定参照LE等<sup>[14]</sup>、王小艺等<sup>[15]</sup>、张海滨等<sup>[16]</sup>方法),质量为0.80~0.85 g·头<sup>-1</sup>。过氧化氢酶(CAT),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽S转移酶(GSTs),羧酸酯酶(CarE)的试剂盒均购自上海酶联生物公司。质量分数20%的虫酰肼悬浊液购自济南天邦化工有限公司,质量分数25%的灭幼脲购自潍坊华诺生物科技有限公司。BioTek synergyH1多功能酶标仪由美国Bioteck公司生产。云实木屑由天台山1年生云实枝条粉碎制成。蒸馏水稀释虫酰肼和灭幼脲至100 mg·L<sup>-1</sup>后,按V(稀释药液):m(云实木屑)=0.2 L:1.0 kg均匀混合后备用。

### 1.2 试验方法和数据处理

处理好的云实木屑饲喂天牛幼虫。60头·组<sup>-1</sup>,重复3次。对照用同量的蒸馏水处理木屑。饲喂12,24,36,48,60和72 h后分别随机取10头,液氮中研磨后称取0.5 g,放入装有磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)的50 mL离心管中,4℃下6 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,取上清液,即为酶的提取液。提取液分装4管,-20℃保存备用。取样完毕后按试剂盒说明书操作,BioTek synergyH1多功能酶标仪测定酶活性。

用SPSS进行双因素方差分析;用Excel软件分析药物处理后天牛体内酶的变化趋势。

## 2 结果与分析

由表1可以看出:灭幼脲处理组(T<sub>1</sub>组)过氧化氢酶活性与对照组无显著差异;虫酰肼处理组(T<sub>2</sub>组)过氧化氢酶活性下降,相较于对照组以及T<sub>1</sub>组差异显著。就各时段而言,对照组在72 h内各相邻时段之间无明显差异。T<sub>1</sub>组过氧化氢酶活性先上升,24 h后开始下降。T<sub>2</sub>组过氧化氢酶活性在12 h内已低于对照组,并且有持续下降的趋势。无论哪种药物处理,处理组超氧化物歧化酶活性均高于对照组,且差异显著;灭幼脲处理12 h虫体超氧化物歧化酶活性已高于对照组,48 h后继续上升;虫酰肼处理24 h后虫体超氧化物歧化酶迅速上升,之后下降,与对照组差异显著。观测羧酸酯酶活性,处理组和对照组并无显著差异。与对照相比,处理组虫体谷胱甘肽S转移酶活性均显著增高,但处理组间差异不显著;虫酰肼处理后谷胱甘肽S转移酶活性在24 h时达到顶峰,之后下降;而灭幼脲处理后虫体谷胱甘肽S转移酶活性在12 h时已显著升高,之后下降。

## 3 结论与讨论

研究发现:用灭幼脲处理昆虫,虫体内2种氧化酶的活性升高、下降并不是同步的,原因可能是灭幼脲刺激使虫体在短时间内产生的大量自由基激活氧化酶,氧化酶应对速度和持续作用时间存在差异。本试验中,锈色粒肩天牛幼虫被喂饲灭幼脲处理的木屑,虫体氧化酶被激活并与自由基迅速结合;但在分离时过氧化氢酶较超氧化物歧化酶更为迅速,即在虫体内作用时间较短,最终表现为过氧化氢酶活性在24 h后迅速降低,而超氧化物歧化酶一直处于较高水平,持续灭活多余的自由基。用虫酰肼处理虫体后,过氧化氢酶活性低于对照组;超氧化物歧化酶活性高于对照组,但与灭幼脲处理组差异不显著( $P < 0.05$ )。由此猜测,虫酰肼可能会抑制虫体过氧化氢酶的激活,而对超氧化物歧化酶的激活并没有太大的影响,说明虫酰肼刺激下的天牛幼虫体内过氧化氢酶没有参与多余自由基的中和作用。因此,在灭活自由基的过程中,超氧化物歧化酶的作用更为广泛,虫体对虫酰肼产生伤害的抵抗力低于对灭幼

表1 不同处理对天牛体内4种酶的影响

Table 1 Effects of 4 enzymatic activities under different treatments

处理	t/h	酶活性/(×16.67 μkat·L <sup>-1</sup> )			
		CAT	SOD	CarE	GSTs
对照	12	26.06 ± 1.22 aA	47.31 ± 2.49 aA	35.71 ± 7.13 aA	21.71 ± 1.24 aA
	24	25.59 ± 0.28 aA	45.53 ± 2.95 aA	34.83 ± 5.02 aA	21.98 ± 2.14 aA
	36	24.24 ± 2.58 aA	48.92 ± 3.01 aB	30.78 ± 8.89 aA	21.70 ± 2.10 aA
	48	23.41 ± 1.38 aA	52.46 ± 6.21 aC	34.95 ± 7.32 aA	21.97 ± 0.43 aA
	60	23.76 ± 2.53 aA	50.34 ± 2.99 aC	31.51 ± 6.01 aA	21.47 ± 1.53 aA
	72	21.96 ± 3.14 aA	49.88 ± 4.40 aC	28.76 ± 3.28 aA	22.32 ± 2.25 aA
T <sub>1</sub>	12	28.05 ± 4.76 aB	53.62 ± 4.85 bD	35.93 ± 14.56 aA	24.81 ± 0.97 bB
	24	36.49 ± 3.16 aC	52.34 ± 5.40 bD	37.37 ± 16.25 aA	23.08 ± 1.45 bC
	36	20.26 ± 1.75 aD	53.67 ± 3.90 bD	36.52 ± 17.06 aA	24.51 ± 0.61 bD
	48	23.59 ± 3.69 aE	53.25 ± 1.23 bD	34.69 ± 5.87 aA	23.78 ± 1.37 bD
	60	25.54 ± 5.63 aE	49.92 ± 1.22 bE	32.41 ± 8.95 aA	24.78 ± 0.96 bD
	72	17.58 ± 0.80 aF	55.22 ± 1.29 bF	35.36 ± 9.25 aA	24.55 ± 0.68 bD
T <sub>2</sub>	12	19.86 ± 1.12 bG	54.67 ± 2.51 bG	35.31 ± 13.91 aA	22.79 ± 2.70 bE
	24	19.64 ± 5.13 bG	60.09 ± 8.00 bH	37.52 ± 1.61 aA	25.62 ± 4.87 bF
	36	16.35 ± 2.45 bH	52.46 ± 4.77 bI	37.75 ± 5.93 aA	24.27 ± 1.60 bF
	48	18.16 ± 0.66 bH	52.55 ± 0.92 bI	35.40 ± 5.63 aA	23.10 ± 1.10 bF
	60	14.37 ± 1.35 bI	51.82 ± 2.27 bI	33.90 ± 4.55 aA	23.54 ± 1.34 bF
	72	12.93 ± 4.57 bI	45.47 ± 6.61 bJ	36.19 ± 6.78 aA	24.03 ± 4.02 bF

说明：表中数据为平均值±标准差；不同小写字母表示2种处理之间有显著差异( $P<0.05$ )，不同大写字母表示同一处理不同时间段间有显著差异( $P<0.05$ )。

脲，用虫酰肼防治锈色粒肩天牛的效果可能优于灭幼脲。

DHADIALLA等<sup>[17]</sup>研究表明，用蜕皮激素处理虫体时，虫体会出现拒食、蛋白质合成增多等情况。徐希宝<sup>[18]</sup>指出在棉铃虫体内谷胱甘肽S转移酶活性和抗性形成有关。本研究发现，不管是用虫酰肼还是灭幼脲刺激锈色粒肩天牛幼虫，虫体内的谷胱甘肽S转移酶活性都明显高于对照组，因此猜测锈色粒肩天牛体内谷胱甘肽S转移酶活性升高也是一种自我调控产生抗性的过程；谷胱甘肽S转移酶活性的提高可以加快虫体内有害物质的代谢，SMAGGHE等<sup>[19]</sup>也指出虫酰肼代谢的加快是抗性产生的重要原因。谷胱甘肽S转移酶和羧酸酯酶都是昆虫体内的主要解毒酶，但是，在用药物处理后，羧酸酯酶活性和对照组相比并无显著差异，这可能从侧面说明虫体对虫酰肼和灭幼脲的抗性是由谷胱甘肽S转移酶直接体现的，换而言之，谷胱甘肽S转移酶可能是昆虫抗性的重要标志物。

虫酰肼和灭幼脲是昆虫激素类似物，对于昆虫的机体调控作用大于直接的毒杀作用，且该调控作用有一个长期的过程。因此，在此之后还需要观察这2种药物对锈色粒肩天牛整个的生长发育过程，从而为防治天牛提供更多的理论基础。

#### 4 参考文献

- [1] 卢希平, 杨忠岐, 孙绪良, 等. 利用花绒寄甲防治锈色粒肩天牛[J]. 林业科学, 2011, 47(10): 116–121.  
LU Xiping, YANG Zhongqi, SUN Xugen, et al. Biological control of *Apriona swainsoni* (Coleoptera: Cerambycidae) by releasing the parasitic beetle *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrideridae) [J]. *Sci Silv Sin*, 2011, 47(10): 116–121.
- [2] 周亚军, 赵从志. 锈色粒肩天牛的初步研究[J]. 河南农业大学学报, 1987, 21(1): 65–70.  
ZHOU Yajun, ZHAO Congzhi. Preliminary studies on *Apriona swoeingeni* (Hope) [J]. *Acta Agric Univ Henan*, 1987, 21(1): 65–70.
- [3] 孙丹萍. 锈色粒肩天牛幼虫空间分布型及抽样技术研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(3): 120–123.  
SUN Damping. Study on the spatial distribution pattern and sampling techniques of the larvae of *Apriona swainsoni*

- (Hope) [J]. *J Northwest For Univ*, 2007, **22**(3): 120 – 123.
- [4] 曹广春. 小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 对虫酰肼的抗性及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.  
CAO Guangchun. *Studies on Resistance of Diamondback Moth Plutella xylostella (L.) to Tebufenozide and the Mechanisms* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.
- [5] 崔全敏, 王开运, 汪清民, 等. 2种虫酰肼类新化合物对5种鳞翅目害虫的生物活性[J]. 昆虫学报, 2008, **51**(5): 492 – 497.  
CUI Quanmin, WANG Kaiyun, WANG Qingmin, et al. Bioactivities of two tebufenozide derivatives against five lepidopteran pests [J]. *Acta Entomol Sin*, 2008, **51**(5): 492 – 497.
- [6] WELLINGA K, MULDER R, van DAALEN J J. Synthesis and laboratory evaluation of 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3-phenylureas, a new class of insecticides. 1-(2,6-Dichlorobenzoyl)-3-phenylureas [J]. *J Agric Food Chem*, 1973, **21**(3): 348 – 354.
- [7] 金敏娜, 林欣大. 保幼激素在昆虫中的分子作用机理[J]. 生态学报, 2014, **34**(6): 1362 – 1370.  
JIN Minna, LIN Xinda. Molecular mechanisms of the insect juvenile hormone [J]. *Acta Ecol Sin*, 2014, **34**(6): 1362 – 1370.
- [8] 唐进根. 灭幼脲在桑天牛 *Apriona germari* (Hope) 世代间的传递机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2001.  
TANG Jinggen. *The Transfer Mode of Diflubenzuron (DFB) in Between Generations of Mulberry Borer Apriona germari (Hope) (Coleoptera: Cerambycidae)* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2001.
- [9] 田铃. 桑天牛保幼激素生物合成机制及其对生殖的调控[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.  
TIAN Ling. *The Study on Biosynthetic Mechanism of Juvenile Hormone in Apriona germari and Its Regulation on Reproduction* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.
- [10] 杨荣萍, 刘明辉, 曾春, 等. 灭幼脲的作用机理及其在林业害虫防治中的应用[J]. 现代农业科技, 2010(15): 220 – 223.  
YANG Rongping, LIU Minghui, ZENG Chun, et al. mechanism of diflubenzuron and its application in control of forest pests [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2010(15): 220 – 223.
- [11] TASSOU K T, SCHULZ R. Low field-relevant tebufenozide concentrations affect reproduction in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in a long-term toxicity test [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2013, **20**(6): 3735 – 3742.
- [12] MCCORD J M, FRIDOWICH I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein) [J]. *J Biol Chem*, 1969, **244**(22): 6049 – 6055.
- [13] 张永强. 黄花蒿杀螨物质活性追踪及杀螨作用机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.  
ZHANG Yongqiang. *Studies on Acaricidal Action Mechanism and Bio-guided Isolation of Bioactive Substance from Artemisia annua L.* [D]. Chongqing: Southwest University, 2008.
- [14] LE Baothanh, 颜学武, 许潜. 桑天牛幼虫龄数林间识别研究[J]. 湖南林业科技, 2014, **41**(1): 7 – 13.  
LE Baothanh, YAN Xuewu, XU Qian. Study on larval feces and instar identification of *Apriona germari* (Hope) [J]. *J Hunan For Sci Technol*, 2014, **41**(1): 7 – 13.
- [15] 王小艺, 杨忠岐, 唐艳龙, 等. 栗山天牛幼虫龄数和龄期的测定[J]. 昆虫学报, 2012, **55**(5): 575 – 584.  
WANG Xiaoyi, YANG Zhongqi, TANG Yanlong, et al. Determination of larval instar number and duration in the oak longhorn beetle, *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Acta Entomol Sin*, 2012, **55**(5): 575 – 584.
- [16] 张海滨, 王建伟, 朱小峰, 等. 星天牛幼虫龄期的划分[J]. 应用昆虫学报, 2011, **48**(3): 688 – 694.  
ZHANG Haibin, WANG Jianwei, ZHU Xiaofeng, et al. Dermination of larval instars of citrus long-horned beetle, *Anoplophora chinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Chin J Appl Entomol*, 2011, **48**(3): 688 – 694.
- [17] DHADIALLA T S, CARLSON G R, LE D P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity [J]. *Annu Rev Entomol*, 1998, **43**: 545 – 569.
- [18] 徐希宝. 与谷胱甘肽S-转移酶相关联的棉铃虫对甲氧虫酰肼的抗性机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.  
XU Xibao. *Mechanisms of Resistance to Methoxyfenozide Related to Glutathione S-transferase in Cotton Bollworm, Helicoverpa armigera* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.
- [19] SMAGGHE G, DHADIALLA T S, DERYCKE S, et al. Action of the ecdysteroid agonist tebufenozide in susceptible and artificially selected beet armyworm [J]. *Pest Manage Sci*, 1998, **54**(1): 27 – 34.