

川楝素对菜青虫呼吸作用及其它 几种生理指标的影响^{*}

张 兴

赵善欢

(西北农业大学植保系)

(昆虫毒理研究室)

摘要 本文报道了川楝素对菜青虫幼虫呼吸作用的影响及其它几种生理指标的测定结果。川楝素中毒的幼虫呼吸强度降低,呼吸商升高,呼吸节律完全失去控制而为直线型。结合幼虫血淋巴总量、比重、含糖量、pH值、蛋白含量及肠液pH值等生理指标测定结果,说明川楝素中毒的菜青虫幼虫的生理代谢受到干扰,体内进行不正常的生物氧化,且代谢水平降低。同时也证明对幼虫中枢神经有抑制作用。

关键词 川楝素;菜青虫;植物杀虫剂

川楝素(Toosendanin)是从楝属植物中提取出来的一种具有医用及生理和杀虫活性的四环三萜烯类化合物^[1]。近年来的研究证明,川楝素对蔬菜上的主要害虫——菜青虫具有强而特殊的生物活性^[2]。我们就川楝素对菜青虫的毒效及作用机制方面作了一系列研究和探讨。本文报道川楝素对菜青虫幼虫呼吸作用及其它几种生理指标影响结果的测定情况,以便为进一步研究川楝素的毒理机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 川楝素纯品

由天津南开大学元素所尚稚珍教授提供,色谱纯。

1.2 试虫及处理

从田间采回菜青虫(*Pieris rapae* L.)幼虫,用甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)叶在室内饲养,挑出发育正常的五龄前期幼虫(取食试验)或五龄中期幼虫(注射试验)供试。取食处理是用定量点滴川楝素丙酮液的甘兰叶碟(2.0 μg/片)饲喂试虫,选取8 h内吃完者参试(即每头虫取食川楝素2 μl)。另设不定量取食处理,待试虫中毒(体收缩,少动)、昏迷后挑出参试。对照组取食等量丙酮处理的叶碟。注射处理是用接有自制玻璃针头的微量点滴仪从腹侧注射药液于试虫血腔中,设注射剂量为1, 2.5, 5 μg/头3个处理,对照组注射等量溶剂(丙酮,双蒸无菌水,1:1;每头幼虫的注射液量为2.5 μl)。

1.3 呼吸强度及呼吸商的测定

于饲喂处理后12 h取试虫用瓦勃(Warburg)呼吸仪进行测定。反应槽水温30℃,每次测15 min,重复测2次,每处理6个测定管(即重复6次),分别测出耗氧量和CO₂释放量。测定后置试虫于正常条件下用新鲜叶子继续饲养,然后又于24, 48 h分别再以相同条

* 该研究部分工作得到国家教委优秀年轻教师基金资助
1991-03-12收稿

件继续测定。为了保证每次测定时试虫的生理状况不受明显影响,在连续多次呼吸作用测定中,每次测定时只称试虫体重,不测其体积。在呼吸率计算中只用菜青虫体重与体积的关系式($Y=0.9712+0.9782X$)来计算试虫的体积^[4],用作耗氧量和 CO_2 释放量的计算。

1.4 呼吸节律测定

于取食后 24 h 及注射后 1.5, 3, 8 h, 用 Bios 4-2 型红外线 CO_2 分析仪(西德 LEYBOLD-HERAEUS 公司)测定试虫的呼吸节律。测定时将试虫装于一自制的密闭玻璃小室($\varnothing 2.5\text{ cm} \times 8\text{ cm}$, 一端烧接细通气管, 一端开口, 用接有细通气管的皮塞塞住, 两端通气口均挡有纱网, 以防试虫钻入通气管)。各处理均挑取体重相近($\pm 3\text{ mg}$)的试虫, 以防引起各处理间的误差, 每处理均分单虫测定和 3 头虫为一组测定。测试结束后, 拼接各处理的记录图纸, 拍照后晒成一定比例大小的照片, 再据照片绘制成测定结果图。

1.5 其它几种生理指标测定

试虫处理方法同前, 只将取食川楝素量增至 $3\text{ }\mu\text{g}/\text{头}$, 分别于取食后 24, 48, 72 h 进行测定。并设有饥饿 72 h 的处理, 以校正试虫因对川楝素拒食而饥饿所引起的生理变化。用常规的称重放血法测定血淋巴总量, 用常规的硫酸铜标准液比重测定法测定血淋巴的比重, 用常规的蒽酮法测定血淋巴中总糖量, 血淋巴及中肠组织中的蛋白含量测定采用 Folin-酚法^[11]; 血淋巴、肠液 pH 测定中, 每处理取 150 头试虫, 用电刺激法取其肠液, 然后取其血淋巴分别装于测定管中。血淋巴中加入少许苯基硫脲以抗凝。整个取样均在冰浴中进行。用 EA-940 离子计(美国制)测定其 pH 值。以上各项指标测定中, 除肠液 pH 测定中用虫较多外, 其余试验中各处理用试验幼虫约 30~50 头。

2 试验结果

呼吸强度测定结果(表 1)表明, 试虫取食川楝素后, 耗氧量显著降低, 12 h 后的耗氧量仅为对照的 55.1%。但在 24, 48 h 后分别测定却有逐渐复原的趋势。昏迷组的耗氧量降低幅度并不大。呼吸商测定结果表明, 处理幼虫的呼吸商均接近于 1。昏迷组甚至超过了 1, 为 1.0426, 而对照组为 0.8417。但也可看出, 随着时间的延长, 呼吸商有下降的趋势。这里应说明的是, 在该测定中由于考虑到该试验的特殊性和连续性, 给试虫的投药量偏低, 而且受药后昏迷和死亡虫体挑出不用, 供试昆虫最后大都可恢复正常。所以, 耗氧量或呼吸商均有趋于正常的现象。

表 1 菜青虫取食川楝素后呼吸作用测定结果

处 理	O_2 消耗量 ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)	CO_2 放出量 ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)	呼吸商 (CO_2/O_2)
取食 12 h	0.0756 ± 0.0101	0.0754 ± 0.0102	0.9973
取食 24 h	0.0943 ± 0.0106	0.0915 ± 0.0110	0.9703
取食 48 h	0.1146 ± 0.0231	0.1063 ± 0.0224	0.9276
昏 迷	0.1079 ± 0.0206	0.1125 ± 0.0194	1.0435
对 照	0.1371 ± 0.0113	0.1154 ± 0.0191	0.8417

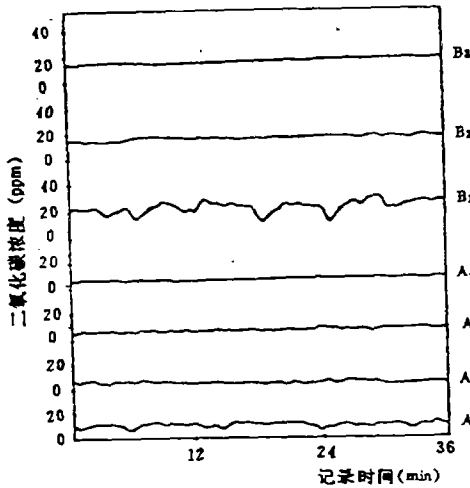


图 1 饲喂川楝素后对菜青虫五龄幼虫呼吸节律的影响

红外线二氧化碳测定仪测定结果。温度：17℃，气流：20 L/hr，记录仪纸速：5 mm/min；试虫体重范围：210~213 mg。A₁ 用 1 头虫测定结果（A₁：对照；A₂：饲喂 2 μg/头；A₃：中毒；A₄：昏迷）。B₁ 用 3 头虫测定结果（B₁：对照；B₂：中毒；B₃：昏迷）。

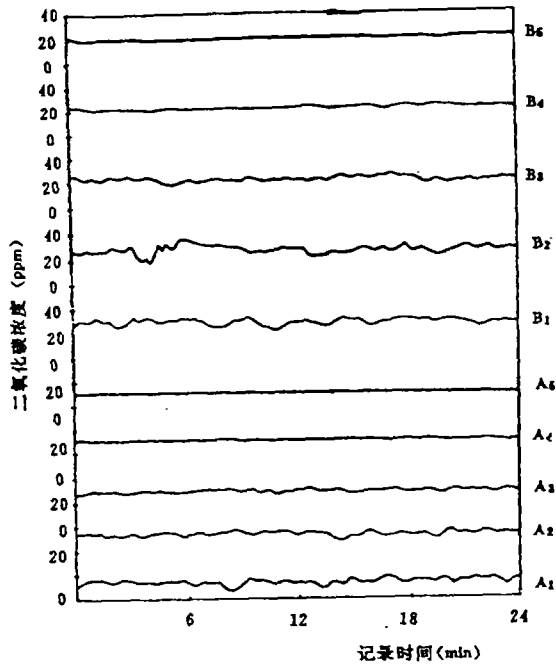


图 2 注射川楝素后对菜青虫五龄幼虫呼吸节律的影响

A₁ 用 1 头虫测定结果（A₁：空白对照；A₂：注射对照；A₃：1 μg/头；A₄：2.5 μg/头；A₅：5 μg/头）。B₁ 用 3 头虫测定结果（B₁：空白对照；B₂：注射对照；B₃：1 μg/头；B₄：2.5 μg/头；B₅：5 μg/头）。红外线二氧化碳测定仪测定条件：温度：19℃；气流：20 L/hr，记录仪纸速：10 mm/min；试虫体重范围：254~256 mg。

呼吸节律测定结果表明，取食了川楝素以后的试虫呼吸均失去了节律，而且 CO₂ 释放量明显降低（图 1）。中毒和昏迷组基本上无明显波动而近于直线型。而且分别用 1 头虫和 3 头虫测试所得结果基本相同。经过多次测定，证明对照组试虫呼吸节律属不规则波动型^[1]。

在注射组呼吸节律测定中发现，注射川楝素后对试虫呼吸及 CO₂ 释放量和取食组相似，也有明显影响，注射后 3 h 测定，1 μg/头剂量组 CO₂ 释放量约比对照组低 30%，且波动不明显。2.5 μg/头注射组便完全失去节律，而且用 1 头虫测定和用 3 头虫测定的结果也基本相同（图 2）。

注射后不同时间呼吸节律测定结果表明，在 1 μg/头处理中，注射后 8 h，其呼吸表现出明显失常。而 2.5 μg/头处理中，注射后 2 h 便几乎成平行线型。在 5 μg/头处理中，注射后 1 h 便被明显抑制（图 3）。说明随着注射剂量的增加及注射后时间的延长，试虫 CO₂ 释放量随之降低，且呼吸节律逐渐被抑制，最后成为完全无节律的平行线型。

表 2 列出了用川楝素处理菜青虫五龄幼虫后几项生理指标测定结果。取食川楝素 1~3 天后的试虫血淋巴总量和对照组相比无明显变化，而饥饿组试虫血淋巴总量却显著下降，只是对照组的 38.4%。处理组血淋巴比重和饥饿组相似，随着时间的延长而有所下降。处

表2 用川楝素处理菜青虫五龄幼虫后几项生理指标测定结果

处 理	试虫体 重 (mg)	血 浆 巴					肠液 pH	中肠组织 蛋白含量 (mg/头)
		比 重	总 量 (ml/100g 体重)	总糖量 (mg/ml)	pH	蛋白含量 (mg/ml)		
取食(24 h)	197.7±18.3	1.033 5	66.69	25.149	7.30	49.118	9.05	1.127 3
取食(48 h)	181.3±21.2	1.030 0	68.20	24.562	7.10	38.658	8.16	0.999 4
取食(72 h)	176.1±23.4	1.023 0	68.91	24.711	6.92	34.587	7.82	0.894 1
昏 迷	217.3±16.3	1.031 6	69.73	25.069	7.32	46.170	7.32	0.997 2
注射(24 h)	201.3±23.0	—	—	22.465	7.12	47.190	8.95	1.139 3
饥饿(72h)	165.9±13.2	1.026 5	26.48	21.374	—	45.237	—	—
对 照	222.7±16.4	1.032 0	68.97	24.446	6.78	49.485	9.17	1.491 6

理组血淋巴总糖量不但不降低, 反而略有升高, 而饥饿组却明显降低。值得注意的是注射组血淋巴总糖量也有降低。幼虫取食川楝素后, 血淋巴 pH 值升高, 昏迷组和注射组也升高, 在取食后第 2, 3 天却逐日降低, 但仍高于对照组。肠液 pH 值明显降低, 取食后第 3 天仅为 7.82, 而昏迷组仅为 7.32, 显著低于对照 (9.17)。

血淋巴、中肠组织中蛋白含量测定结果表明, 二者具有相似的趋势 (表 2)。取食 24 h 后测定, 血淋巴中蛋白含量无明显变化, 但中肠组织中已有所下降。取食后 48, 72 h 则均有明显下降。72 h 后, 血淋巴中蛋白含量比对照下降了 30.1%, 中肠组织中下降了 40.1%。注射组的蛋白含量也有所下降, 而以中肠组织下降较为明显。昏迷组则较特殊, 血淋巴中蛋白含量下降了 6.7%, 但中肠组织中下降了 33.1%。从蛋白含量测定结果可看出, 血淋巴受影响较小, 且较缓慢。但中肠组织却受影响较大且变化较迅速。特别是注射 24 h 后测定结果和取食后 24 h 的相似, 是否中肠组织对川楝素有特殊的亲和力则有待于进一步研究。

3 讨论

川楝素可干扰昆虫正常的生理代谢。中毒的菜青虫虽然几天内不再取食, 但血淋巴总量不因此而减少, 而饥饿幼虫便显著减少。中毒幼虫呼吸率也发生变化, 耗氧量降低, CO_2 释放量虽也降低, 但呼吸商接近于 1 甚至超过 1 而明显高于对照。昏迷组的呼吸商为 1.0426, 应主要代谢碳水化合物, 但血淋巴总糖量反而高于对照。可见幼虫经川楝素处理后, 体内的呼吸代谢发生紊乱, 进行不正常的生物氧化。肠液 pH 值的显著变化会引致消化系统的生理病变 (或是因生理病变而导致 pH 降低), 阻抑食物消化及养分吸收而影响代谢活动。这些现象的出现, 结合血淋巴 pH 值的变化, 说明川楝素中毒虫体的正常生理代谢受到干扰, 且代谢水平降低。另外, 血淋巴, 中肠组织中蛋白含量的降低, 除可直接影响幼虫正常的生理活动及发育外, 是否也标志着与其生理代谢有关的酶类的生成及活性有关, 则还需再作测试。

川楝素可抑制昆虫的呼吸中枢。川楝素可致菜青虫呼吸完全失去节律。昆虫的呼吸中枢位于腹神经索, 由此发出指令而控制呼吸节律。所以, 呼吸节律上的显著变化表明对试虫的呼吸中枢也有抑制作用。动物试验结果表明, 川楝素引致大白鼠呼吸衰竭主要是由于对呼吸中枢的抑制作用而致^[2]。但是昆虫的神经系统不象脊椎动物那样有一个特殊的“呼吸控制中心”, 而是腹神经索的每一腹部神经节都含有控制该节气门和气管分支活动的呼吸中

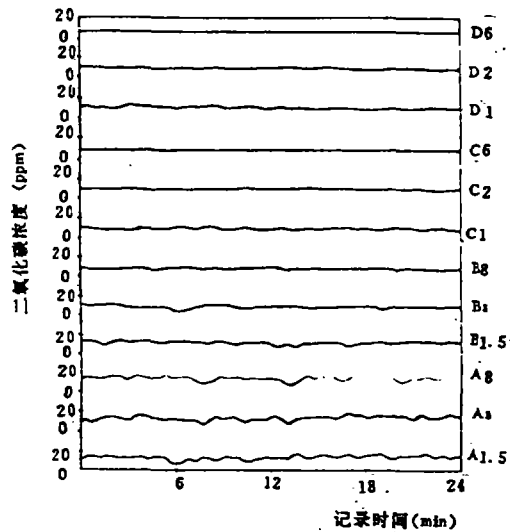


图 3 注射川楝素后不同时间菜青虫幼虫呼吸节律变化情况

A: 注射对照; B: 1 $\mu\text{g}/\text{头}$; C: 2.5 $\mu\text{g}/\text{头}$; D: 5 $\mu\text{g}/\text{头}$ 。字母后数字为注射后的时间 (h)。测定条件与图 2 相同。

心,而脑对呼吸率有协调作用。菜青虫经川楝素处理后,呼吸完全失去节律,即各体节的呼吸控制中心均失控。这是否是因脑神经失去协调则需作进一步研究。

对于川楝素对昆虫神经传导的阻遏作用有必要作深入探讨。动物试验已证明,川楝素对大鼠是一个选择性的作用于突触前的神经—肌肉传递阻遏剂^[8,10]。并认为,川楝素的作用包括对乙酰胆碱(Ach)释放的易化和最后的抑制两个时相^[9]。在昆虫试验中,川楝素中毒的菜青虫可以出现麻痹、昏迷现象,并证明对呼吸中枢有明显的抑制作用。我们在其它试验中还发现,川楝素中毒的菜青虫幼虫头部Ach含量比正常幼虫少46.8% (详情另有报道)。周培爱等^[5]用蛙蟥作试验,证明川楝素也可引致麻痹、昏迷。并用电生理试验证实对介质为Ach的腹VI神经节突触传递有不可逆的阻断作用。此阻断作用也发生在突触前^[11]。可见,川楝素对昆虫神经传导的阻断作用与动物试验结果极相似。但因昆虫神经系统的传递介质比较复杂,故还需对此方面作进一步深入的测试和研究。

参 考 文 献

- 1 王荫长,龚国驹,陈长琨等. 昆虫呼吸节律及其应用价值的初步研究. 南京农学院学报, 1982 (1): 50~58
- 2 田文皓,王忠兴,魏乃森. 川楝素对呼吸中枢的抑制作用. 生理学报, 1980, 32 (4): 338~342
- 3 张兴,张民力,赵善欢. 楝属川楝素含量与生物活性的关系. 华南农业大学学报, 1988, 9 (4): 21~30
- 4 张兴,王兴林. 几种常见昆虫体重与体积的关系. 昆虫知识, 1989, 26 (3): 174~175
- 5 周培爱,罗林儿,柏冬林等. 川楝素对蛙蟥第VI腹神经节突触传递的阻断作用. 北京大学学报, 1987, (2): 71~76
- 6 赵善欢,曹毅,彭中健等. 应用天然植物产品川楝素防治菜青虫试验. 植物保护学报, 1975, 12 (2): 125~131
- 7 赵善欢,张兴. 植物性物质川楝素的研究概况. 华南农业大学学报, 1987, 8 (2): 57~67
- 8 施玉樑,魏乃森,杨亚琴等. 一种作用于突触前的神经肌肉接头传递阻断剂——川楝素. 生理学报, 1980, 32 (3): 293~297
- 9 施玉樑,王文萍,顾寿琪等. 钙离子和神经活动对川楝素引起的小终板电位频率变化的影响. 生理学报, 1982, 34 (3): 304~309
- 10 黄世楷,宋秀娥,施玉樑. 川楝对小白鼠神经肌肉接头的超微结构的影响. 生理学报, 1980, 32 (4): 385~390
- 11 Lowry O H, N J Rosebrough, A L Farr et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951 (193): 265~275
- 12 Zhang Yeguang, Chiu Shin-Foon Preliminary investigation of some deterrents against the imported cabbage worm (*Pieris rapae* L.). Neem Newsletter. 1985, 2 (3): 30~32
- 13 Zhou Peiai, Luo Liner, Bai Donglin, et al. Toosendanin, a natural product, as a neurotoxin and antifeedant. 6th International Congr. Pesticide Chemistry, Canada. 1986

EFFECTS OF TOOSENDANIN ON THE RESPIRATION AND OTHER PHYSIOLOGICAL
PARAMETERS OF THE IMPORTED CABBAGE WORM (*Pieris rapae* L.)

Zhang Xing

Chiu Shin-Foon

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University)

(Laboratory of Insect Toxicology)

Abstract Determinations of respiration and other physiological parameters of imported cabbage worm (*Pieris rapae* L.) treated with toosendanin, an extract from the bark of *Melia toosendan*, were conducted in the Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University in 1988. In the experiments on respiration with a Warburg respirimeter, marked decrease in oxygen uptake was observed. It was $0.1371 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ in the controls as compared with $0.094 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ in the treated larvae. The respiratory quotient increased from 0.8417 (control) to 0.9703 (treated) and even up to 1.0426 (paralysed larvae). The respiratory rhythm as examined with Infra-red CO_2 Analyzer was interfered with greatly, no respiratory rhythm was observed in the intoxicated and paralysed larvae. Determinations of some physiological parameters showed that total volume of hemolymph in the treated larvae did not change significantly, but the pH of the hemolymph increased from 6.78 (control) to 8.16 (48 hr after treatment), and the pH of intestinal juice decreased from 9.17 (control) to 7.82 (72 hr after treatment). The protein content in the hemolymph and in the tissue of the ventriculus of the treated larvae also decreased markedly. The larvae after starving for 3 days did not show any change in pH in the hemolymph and intestinal juice, but the volume of hemolymph decreased significantly, being 38.4% of the control. This seemed to indicate that the pathological changes in the larvae treated with toosendanin were not caused by its antifeedant properties. All the results of the observations indicated that the metabolism of the treated larvae was interfered with and the normal activities of the nervous system were also inhibited by toosendanin.

Key words Toosendanin; *Pieris rapae* L.; Botanical insecticides