

杀菌剂对斜纹夜蛾 SL 细胞系和幼虫的生物活性

张瑞峰^{1,3}, 任永霞^{1,2}, 徐汉虹^{1,2}, 张志祥^{1,2,*}

(1. 农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642; 2. 华南农业大学昆虫毒理研究室, 广州 510642;
3. 天津出入境检验检疫局, 天津 300457)

摘要:以 MTT 法筛选了 19 种杀菌剂对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* SL 细胞的毒杀活性, 并以该方法研究了三唑类杀菌剂对 SL 细胞的毒力。结果表明: 福美双、烯唑醇、己唑醇、氟硅唑、苯霜灵、苯醚甲环唑、戊唑醇和腈菌唑等杀菌剂对 SL 细胞具有优异的毒杀活性。三唑类杀菌剂腈菌唑、烯唑醇、己唑醇和戊唑醇处理 SL 细胞 48 h 后, LC_{50} 值分别为 21.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、23.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、33.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 47.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以考马斯亮蓝 G_{250} 法研究了腈菌唑对 SL 细胞中蛋白质含量和乳酸脱氢酶(LDH)漏出率的影响, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 腈菌唑处理 12 h、24 h、48 h 和 72 h 后, SL 细胞中蛋白质含量分别降低 8.55%、25.95%、42.95% 和 67.05%。处理 24 h 和 48 h 后, SL 细胞的 LDH 漏出率分别为 30.66% 和 32.05%。以浸叶喂食法处理斜纹夜蛾 3 龄幼虫, 三唑类杀菌剂可显著抑制试虫体重增长。以 0.5 $\mu\text{g}/\text{头}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{头}$ 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{头}$ 剂量的腈菌唑注射处理 72 h 后, 斜纹夜蛾 4 龄幼虫血细胞数量分别降低 12.31%、25.96% 和 25.73%。腈菌唑注射处理 48 h 和 72 h 后, 对斜纹夜蛾幼虫的 LD_{50} 值分别为 1.59 $\mu\text{g}/\text{头}$ 和 1.53 $\mu\text{g}/\text{头}$ 。结果显示以离体培养细胞为对象, 从现有杀菌剂中寻找新的杀虫剂先导化合物具有良好的研究潜力。

关键词:斜纹夜蛾; 杀菌剂; 腈菌唑; 斜纹夜蛾细胞系; 细胞毒力

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)07-0689-06

Bioactivities of fungicides against *Spodoptera litura* cells and larvae

ZHANG Rui-Feng^{1,3}, REN Yong-Xia^{1,2}, XU Han-Hong^{1,2}, ZHANG Zhi-Xiang^{1,2,*} (1. Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China; 2. Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Tianjing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300457, China)

Abstract: The cytotoxicities of 19 kinds of fungicides against *Spodoptera litura* (SL) cells were studied by using MTT method. The results showed that thiram, diniconazole, hexaconazole, flusilazole, benalaxyl, difenoconazole, tebuconazole and myclobutanil possessed high toxicity against SL cells. The LC_{50} values of myclobutanil, diniconazole, hexaconazole and tebuconazole, which belong to triazoles fungicides, at 48 h after treatment were 21.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 23.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 33.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 47.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Effect of myclobutanil on the protein content and the leakage rate of lactate dehydrogenase (LDH) of SL cells were studied by using colorimetric method of Coomassie brilliant blue G_{250} . The reduced rates of protein content of SL cells treated with myclobutanil at concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 12 h, 24 h, 48 h and 72 h were 8.55%, 25.95%, 42.95% and 67.05%, respectively. The leakage rates of LDH of SL cells treated with myclobutanil at concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h and 48 h were 30.66% and 32.05%, respectively. Triazoles fungicides could decrease the larvae weight of *S. litura* obviously. The reduced rates of blood corpuscles of the 4th-instar larvae of *S. litura* treated with myclobutanil at dose of 0.5 $\mu\text{g}/\text{larva}$, 1.0 $\mu\text{g}/\text{larva}$ and 2.0 $\mu\text{g}/\text{larva}$ by the inject method for 72 h were 12.31%, 25.96% and 25.73%, respectively. The LD_{50} values of myclobutanil injected into *S. litura* larvae at 48 h and 72 h after treatment were 1.59 $\mu\text{g}/\text{larva}$ and 1.53 $\mu\text{g}/\text{larva}$, respectively. The results suggest that it possesses good research potential that looking for new leading compounds for insecticides from fungicides with vitro cultured cells as object.

Key words: *Spodoptera litura*; fungicide; myclobutanil; SL cell line; cytotoxicity

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(036837)

作者简介: 张瑞峰, 男, 1983 年生, 内蒙古人, 硕士研究生, E-mail: rfzhang1983@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 020-85285127; E-mail: zdsys@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-11-22; 接受日期 Accepted: 2007-03-20

目前绝大多数商品化杀虫剂对微生物的杀灭活性较低,绝大多数杀菌剂对害虫的控制作用不佳。然而,从细胞生物学的角度看,昆虫与微生物具有统一性,那就是细胞是两者的生命基础。很多杀虫剂或杀菌剂在昆虫或微生物体内的靶标具有统一性。如杀虫剂鱼藤酮、杀菌剂敌枯双、敌克松和联苯酚的作用位点均是细胞线粒体上的电子传递链(赵善欢, 2001),但它们对昆虫和微生物的活性存在巨大的差异。昆虫细胞和微生物细胞具有共同性,如果能够抑制两者共有的作用位点,杀菌剂可能对昆虫细胞具有良好的毒杀活性,能够杀死昆虫细胞的杀菌剂不一定能有效毒杀昆虫,但是这样的药剂有可能成为新型杀虫剂的先导化合物,即通过结构优化,改变该药剂对昆虫膜系统的穿透性,提高对靶标的攻击率,就有可能使该杀菌剂对活体昆虫表现出控制作用。

本实验的目的是寻找对昆虫离体细胞具有良好毒杀活性的杀菌剂,研究该药剂对昆虫离体细胞、活体细胞及活体昆虫的影响,探讨从杀菌剂中寻找杀虫剂活性先导化合物的可能,以期建立一种新的杀虫剂先导化合物的途径和方法。

1 材料与方法

1.1 供试生物

SL 细胞系为斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 卵巢细胞,由华南农业大学昆虫毒理研究室室内传代培养。培养基为 Grace's Insect Cell Culture Medium,添加 8% 的新生牛血清,27.5℃ 恒温培养。

斜纹夜蛾卵块采自华南农业大学农场芋头叶上,低龄幼虫用芋头叶饲养,高龄幼虫用木薯叶饲养。

1.2 供试药剂及仪器

98% 鱼藤酮晶体,美国 Sigma 公司生产;95% 己唑醇原药、95% 烯唑醇原药、97% 戊唑醇原药和 95% 多效唑原药,江苏盐城利民农化有限公司生产;95% 腈菌唑原药、95% 苯醚甲环唑原药、95% 啉霉胺原药和 95% 烯酰吗啉原药,江苏耕耘化学有限公司生产;99% 二氰蒽醌原药和 98% 腐霉利原药,浙江禾益农化有限公司生产;95% 醚菌酯原药和 92% 氟硅唑原药,安徽华星化工股份有限公司生产;98% 福美双原药,河北冠龙农化有限公司生产;60% 井冈霉素原药,湖北武汉科诺生物农药有限公司生产;98% 咪鲜胺原药,江苏辉丰农化股份有限公司生产;87% 乙磷铝原药,山东大成农药公司生

产;98% 苯霜灵原药,浙江一帆农化厂生产;90% 啶菌恶唑原药,沈阳化工研究院试验厂生产;95% 溶菌灵原药,新沂中凯农用化工有限公司生产。

Plus 酶标仪,美国 Bio-RELD 公司生产;7230G 型可见分光光度计,上海长方光学仪器有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 19 种杀菌剂对 SL 细胞的毒力测定方法:于 96 孔培养板中加 100 μL 处于对数生长期的 SL 细胞(密度约为 1×10^4 个/mL),待细胞贴壁后加药处理,对照加含有 2% 丙酮的细胞培养液,于处理后 48 h 用 MTT 法(Mosmann, 1983;周青春等, 1998;张志祥等, 2000)测定 19 种杀菌剂对 SL 细胞的毒力。

1.3.2 腈菌唑对 SL 细胞蛋白质含量和乳酸脱氢酶(LDH)漏出率的测定方法:(1)蛋白质含量测定方法:于 24 孔板中加入 400 μL 处于对数生长期的细胞,待细胞贴壁后加入腈菌唑,使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理 12 h、24 h、48 h 和 72 h 后用考马斯亮蓝 G_{250} 法(张卓然, 2004;汤方等, 2005;赵海珍等, 2006)测定 SL 细胞的蛋白质含量。(2)乳酸脱氢酶漏出率测定方法:参照郑东航等(2000)和李素文(2000)方法。选择处于对数生长期的 SL 细胞接种于细胞培养瓶中,待细胞贴壁后加入腈菌唑,使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理 24 h 和 48 h 后分别收集处理组和对照组的细胞培养液并定容,测定其乳酸脱氢酶总活力(代表因细胞膜通透性增高而释放的 LDH 的量);裂解细胞,离心,收集上清液并定容,测定其乳酸脱氢酶总活力(代表存留于细胞内的 LDH 的量)。LDH 漏出率(%) = 培养液 LDH 总活力 / (培养液 LDH 总活力 + 细胞内 LDH 总活力) $\times 100\%$ 。

1.3.3 腈菌唑对斜纹夜蛾幼虫的生物活性测定:用丙酮 + 水(1:1, v/v)将药剂稀释到供试浓度,用微量注射器在斜纹夜蛾 3 龄幼虫的第 2 对和第 3 对腹足之间腹侧注射药液,对照注射等量丙酮 + 水(1:1, v/v)混合物。注射针头朝向虫头,从试虫腹部侧面注入 1 μL 药液,注射完毕后,将试虫放入垫有保湿滤纸的培养皿中,并放入新鲜的木薯叶片,将培养皿置于养虫室(25 \pm 1℃)中。每个浓度 3 个重复,每个重复 10 头幼虫,分别于处理前和处理后 72 h 称试虫体重,并调查试虫死亡情况。

1.3.4 腈菌唑对斜纹夜蛾 4 龄幼虫血细胞数量的影响:注射给药法同 1.3.3,于处理 72 h 后剪破幼虫臀足取幼虫血淋巴,用血球计数板对血细胞进行计数(李季生等, 2006)。

1.3.5 数据处理:毒力回归、方差分析均采用 DPS 数据处理系统分析,用邓肯氏新复极差法(Duncan's multiple range test, DMRT)进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 供试药剂对 SL 细胞的毒杀活性筛选

以 SL 细胞为对象,以杀虫剂鱼藤酮为对照药剂,以 MTT 法对 19 种杀菌剂的细胞毒力进行了筛

选,结果见表 1。从表 1 可以看出,除乙磷铝、溶菌灵、多效唑、咪霉胺、烯酰吗啉、腐霉利和井冈霉素外,其他 12 种杀菌剂在实验浓度下均对 SL 细胞具有良好的毒杀活性,且活性均明显高于同浓度的鱼藤酮。福美双、烯唑醇、己唑醇、氟硅唑、苯霜灵、苯醚甲环唑、戊唑醇和腈菌唑对 SL 细胞表现出优异的毒杀活性,在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量下处理后 48 h,SL 细胞的死亡率均在 90% 以上,而同浓度的鱼藤酮处理后 48 h,SL 细胞的死亡率仅为 51.02%。

表 1 19 种杀菌剂处理 48 h 后对斜纹夜蛾 SL 细胞的毒杀活性

Table 1 Toxicity of 19 kinds of fungicides against *Spodoptera litura* cells at 48 h after treatment

处理 Treatment	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentration	死亡率(%) Mortality	处理 Treatment	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentration	死亡率(%) Mortality
鱼藤酮 Rotenone	100	51.05 \pm 0.60 h	二氟葱醌 Dithinon	100	89.96 \pm 2.34 d
咪鲜胺 Isocarbamide	100	82.66 \pm 1.74 e	醚菌酯 Kresoxin-methyl	100	81.44 \pm 1.44 e
福美双 Thiram	100	94.69 \pm 1.04 bc	苯霜灵 Benalaxyl	100	95.56 \pm 0.87 abc
乙磷铝 Phosethyl-Al	100	20.82 \pm 3.46 l	咪霉胺 Ferimzone	100	55.95 \pm 2.06 g
溶菌灵 Polyoxin	100	24.03 \pm 2.09 k	烯酰吗啉 Dimethomoph	100	37.15 \pm 1.12 j
多效唑 Paclobutrazole	100	42.41 \pm 2.24 h	腐霉利 Procyridone	100	5.09 \pm 1.39 m
烯唑醇 Diniconazole	100	95.70 \pm 1.54 abc	井冈霉素 Jiangangmycin	100	-14.60 \pm 3.23 n
己唑醇 Hexaconazole	100	96.39 \pm 1.39 ab	苯醚甲环唑 Difenconazole	100	96.50 \pm 1.01 ab
啉菌恶唑 Phosphazomycin	100	78.94 \pm 1.86 f	戊唑醇 Tebuconazole	100	93.89 \pm 1.45 c
氟硅唑 Flusilazone	100	97.42 \pm 1.61 a	腈菌唑 Myclobutanil	100	90.49 \pm 0.78 d

注:表中同列数据(平均值 \pm 标准误)后字母相同者,表示在 5% 水平上差异不显著(DMRT);表 3~表 5 同。

Notes: The data (mean \pm SE) within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level (DMRT, $P > 0.05$). The same for Table 3, 4 and 5.

2.2 三唑类杀菌剂对 SL 细胞的毒杀活性

从表 1 可以看出,三唑类杀菌剂对 SL 细胞具有良好的毒杀活性。进一步测定烯唑醇、己唑醇、戊唑醇和腈菌唑对 SL 细胞的毒力,结果表明:腈菌唑、烯

唑醇、己唑醇和戊唑醇对 SL 细胞具有优异的毒杀活性,处理 48 h 后对 SL 细胞的 LC_{50} 值分别为 21.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、23.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、33.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 47.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$,明显高于经典细胞毒剂鱼藤酮对 SL 细胞的毒力(表 2)。

表 2 三唑类杀菌剂处理 48 h 后对斜纹夜蛾 SL 细胞的毒杀活性

Table 2 Toxicity of triazoles fungicides against *Spodoptera litura* cells at 48 h after treatment

处理 Treatment	毒力回归方程 Toxicity regress equation	LC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (95% 置信限, 95% CI)	相关系数 Coefficient correlation
腈菌唑 Myclobutanil	$y = 3.3116 + 1.2589x$	21.94 (16.41 - 29.33)	0.9972
烯唑醇 Diniconazole	$y = 1.5501 + 2.5060x$	23.80 (20.02 - 28.03)	0.9944
己唑醇 Hexaconazole	$y = 1.1427 + 2.5368x$	33.16 (28.28 - 38.14)	0.9916
戊唑醇 Tebuconazole	$y = 2.5376 + 1.4676x$	47.63 (39.58 - 57.31)	0.9900
鱼藤酮 Rotenone	$y = 3.1173 + 0.9363x$	102.49 (72.09 - 145.72)	0.9905

2.3 腈菌唑对 SL 细胞蛋白质含量及 LDH 漏出率的影响

腈菌唑对 SL 细胞蛋白质含量及 LDH 漏出率的影响见表 3。从表 3 可以看出,腈菌唑可以明显降低 SL 细胞中蛋白质含量,在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下处理 12 h、24 h、48 h 和 72 h 后,SL 细胞中蛋白质含量分别降低了 8.55%、25.95%、42.95% 和 67.05%。腈菌唑可导致细胞中 LDH 漏出,在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下处理 24 h 和 48 h 后,SL 细胞中 LDH 漏出率分别为

30.66% 和 32.05%。随着时间的延长,SL 细胞中蛋白质含量显著降低,LDH 漏出率增加。

2.4 三唑类杀菌剂对斜纹夜蛾幼虫的影响

表 1 和表 2 的结果表明,部分杀菌剂对离体培养的 SL 细胞具有良好的毒杀活性。为了明确杀菌剂对活体昆虫的影响,以浸叶喂食法研究了三唑类杀菌剂对斜纹夜蛾幼虫的活性,结果表明:三唑类杀菌剂对斜纹夜蛾幼虫的毒杀活性不理想,在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下处理后 72 h,试虫死亡率与对照差异不显

表 3 腈菌唑对斜纹夜蛾 SL 细胞蛋白质含量及 LDH 漏出率的影响

Table 3 Effect of myclobutanil on the reduced rate of protein content and the leakage rate of LDH

处理时间 Time (h)	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentration	蛋白降低率 (%) Reduced rate of protein content	LDH 漏出率 (%) Leakage rate of LDH
12	20	8.55 ± 2.57 d	
24	20	25.95 ± 2.93 c	30.66 ± 0.86 a
48	20	42.95 ± 3.86 b	32.05 ± 1.55 a
72	20	67.05 ± 3.65 a	

著(表 4)。

三唑类杀菌剂对斜纹夜蛾幼虫体重增长具有明显的抑制作用,在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下处理 72 h 后,烯

唑醇、己唑醇、戊唑醇和腈菌唑对试虫体重增长抑制率分别为 36.79%、39.19%、22.69% 和 52.43% (表 4)。

2.5 腈菌唑注射处理对斜纹夜蛾幼虫血细胞数量的影响

三唑类杀菌剂对 SL 细胞具有良好的毒杀活性,对斜纹夜蛾幼虫体重具有明显影响,但对其毒杀活性不佳。为了明确杀菌剂对活体昆虫细胞的影响,以注射法研究了腈菌唑对斜纹夜蛾幼虫血细胞的活性,结果表明,腈菌唑可明显降低斜纹夜蛾幼虫血细胞数量,在 0.5 $\mu\text{g}/\text{头}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{头}$ 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{头}$ 剂量下注射处理后 72 h,与对照相比,幼虫血细胞数量分别下降 12.31%、25.96% 和 25.73% (表 5)。

表 4 三唑类杀菌剂处理 72 h 后对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的影响

Table 4 Effect of triazoles fungicides against 3rd-instar larvae of *Spodoptera litura* at 72 h after treatment

处理 Treatment	浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentration	体重增长率 (%) Weight increase rate	体重增长抑制率 (%) Reduced rate of weight increase rate	死亡率 (%) Mortality
对照 CK		93.45 ± 6.80 a		0.00 ± 0.00 b
烯唑醇 Diniconazole	500	59.07 ± 4.69 bed	36.79 ± 5.36 b	2.22 ± 2.22 b
己唑醇 Hexaconazole	500	56.83 ± 9.52 bed	39.19 ± 8.27 b	0.00 ± 0.00 b
戊唑醇 Tebuconazole	500	72.25 ± 3.49 bc	22.69 ± 3.16 c	0.00 ± 0.00 b
腈菌唑 Myclobutanil	500	44.45 ± 5.43 d	52.43 ± 4.92 a	2.22 ± 2.22 b
鱼藤酮 Rotenone	100	55.23 ± 7.26 bed	40.90 ± 6.32 b	33.33 ± 3.33 a

注:试验采用浸叶法处理。Notes: Treated with dipping leaf method.

表 5 腈菌唑注射处理 72 h 后对斜纹夜蛾 4 龄幼虫血细胞数量的影响

Table 5 Effect of myclobutanil on blood corpuscles of the 4th-instar larvae of *Spodoptera litura* at 72 h after treatment

剂量 ($\mu\text{g}/\text{头}$) Dose ($\mu\text{g}/\text{larva}$)	血细胞总数 (个/mL) Number of corpuscles				平均血细胞总数 (个/mL) Average number of corpuscles	血细胞降低率 (%) Reduced rate of corpuscles
	I	II	III	IV		
对照 CK	28 800	31 300	30 500	36 900	31 875.00 ± 1 754.22 a	
0.5	26 300	27 200	27 800	30 500	27 950.00 ± 904.16 b	12.31
1.0	23 100	22 200	27 600	21 500	23 600.00 ± 1 372.95 c	25.96
2.0	22 200	21 500	23 700	27 300	23 675.00 ± 1 292.53 c	25.73

2.6 腈菌唑注射处理对斜纹夜蛾幼虫的毒杀活性

虽然腈菌唑对斜纹夜蛾幼虫的浸叶喂食毒杀活性不理想,但以注射法处理幼虫可以明显降低幼虫血细胞数量。为了明确活体细胞数量降低对活体昆虫的影响,以注射法研究了腈菌唑对斜纹夜蛾幼虫

的毒杀活性,结果表明,注射处理后,腈菌唑对斜纹夜蛾 4 龄幼虫具有较好的毒杀活性,处理后 48 h 和 72 h 对斜纹夜蛾 4 龄幼虫的 LD_{50} 值分别为 1.59 $\mu\text{g}/\text{头}$ 和 1.53 $\mu\text{g}/\text{头}$,与鱼藤酮的注射毒杀活性差异不显著(表 6)。

表 6 腈菌唑注射处理对斜纹夜蛾 4 龄幼虫的毒杀活性

Table 6 Toxicity of myclobutanil against 4th-instar larvae of *Spodoptera litura*

处理 Treatment	处理时间(h) Time	毒力回归方程 Toxicity regress equation	LD_{50} ($\mu\text{g}/\text{头}$)($\mu\text{g}/\text{larva}$) (95%置信限, 95% CI)
腈菌唑 Myclobutanil	48	$y = 4.5839 + 2.0766x$	1.59 (1.12 - 2.24)
	72	$y = 4.6121 + 2.1035x$	1.53 (1.09 - 2.15)
鱼藤酮 Rotenone	48	$y = 4.6600 + 2.3785x$	1.39 (1.06 - 1.81)
	72	$y = 4.9777 + 1.9814x$	1.03 (0.77 - 1.36)

3 讨论

本实验供试的 19 个杀菌剂中,有 12 个对 SL 细胞具有优良的毒杀活性,以三唑类杀菌剂为对象,具体研究了杀菌剂对离体细胞、活体细胞与活体昆虫的影响。

三唑类杀菌剂在真菌中的作用机理是抑制细胞膜上甾醇的合成(史建荣等,1992)。甾醇是真菌和昆虫细胞的细胞膜上共有的组分,只是甾醇的具体化合物有所不同。本实验目前的研究结果还没有证明三唑类杀菌剂通过抑制 SL 细胞膜上甾醇的合成而表现出细胞毒力,只是证明了该类杀菌剂对 SL 细胞表现出良好的毒杀活性。

细胞是构成昆虫的基本单位,是昆虫进行物质与能量交流的重要场所,细胞的衰弱和死亡直接影响到昆虫的生命活动(彩万志等,2001),从理论上讲,只要杀菌剂在活体昆虫体内对细胞表现出良好的破坏作用,就可以达到控制害虫生长发育甚至使害虫死亡的目的。然而,在浸叶喂食处理中,对 SL 细胞具有优异毒杀活性的三唑类杀菌剂虽然对斜纹夜蛾幼虫表现出一定的生长发育抑制作用,但毒杀活性不佳。尽管如此,本文作者认为这样的杀菌剂具备作为杀虫剂先导化合物的潜力。

在以离体靶标为对象的高通量筛选中,要求筛选出的化合物对活体生物有效(韩闯和杨盛昌,2005),这些研究一般是先导优化过程中的内容。在寻找先导化合物的过程中,我们没有必要一定强求筛选出的化合物对活体昆虫具有很好的活性。先导优化的过程本身就是为了通过改变化合物的极性及其他指标,提高对昆虫体壁或膜系统的穿透性,提高在虫体内的稳定性,达到对靶标更有效的攻击,从而达到对昆虫良好的控制效果。从这一点上看,以离体昆虫细胞为对象,筛选出的化合物具备成为先导化合物的条件。

虽然浸叶喂食处理后,三唑类杀菌剂对斜纹夜蛾幼虫的毒杀活性不佳,但是注射处理后,对斜纹夜蛾幼虫表现出良好的毒杀活性,可显著减少斜纹夜蛾幼虫血细胞的数量,并导致 LDH 漏出。昆虫血细胞主要有防卫、参与贮存物质代谢、分泌和凝血等作用(彩万志等,2001),血细胞数量的降低对昆虫免疫力、物质代谢等产生影响,从而降低幼虫体重,直至贫血死亡。LDH 是存在于活细胞胞质内的一种酶,在正常情况下是不会透过细胞膜的,只有当细

胞受到攻击而损伤,细胞膜的通透性改变,LDH 会从细胞内漏出释放到介质中去(赵俊萍和张惠丽,2000),细胞内 LDH 减少,培养液中 LDH 增多,测定 LDH 的漏出率可反映药物对 SL 细胞细胞膜的穿孔作用。这些结果表明,三唑类杀菌剂浸叶喂食处理活性不佳的原因是到达靶标的分子数不足,这可能是由于化合物对昆虫中肠穿透率较差造成的。

本研究结果表明,以离体培养细胞为对象,从现有杀菌剂中寻找新的杀虫剂先导化合物具有良好的研究潜力,可为杀虫剂的研究提供新的思路。

参考文献(References)

- Cai WZ, Pang XF, Hua BZ, Liang GW, Song DL, 2001. General Entomology. Beijing: China Agricultural University Press. 124 - 126. [彩万志, 庞雄飞, 花保祯, 梁广文, 宋敦伦, 2001. 普通昆虫学. 北京: 中国农业大学出版社. 124 - 126]
- Han C, Yang SC, 2005. High throughput screening assay and application. *Biotechnology Information*, (2): 22 - 25. [韩闯, 杨盛昌, 2005. 高通量筛选技术及其应用. 生物技术通报, (2): 22 - 25]
- Li JS, Xia AH, Gao HJ, Hu CY, Mu ZM, 2006. Change of cells and activity of phenoloxidase in *Bombyx mori* parasitized by larva of *Exorista sorbillans* Wiedemann. *Acta Sericologica Sinica*, 32(2): 268 - 271. [李季生, 夏爱华, 高绘菊, 胡传英, 牟志美, 2006. 蝇蛆寄生对家蚕血细胞和酚氧化酶活性的影响. 蚕业科学, 32(2): 268 - 271]
- Li SW, 2000. Experimental Tutorial of Cellular Biology. Beijing: Higher Education and Springer Publishing Company. 58 - 66. [李素文, 2000. 细胞生物学实验指导. 北京: 高等教育出版社·施普林格出版社. 58 - 66]
- Mosmann T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, 65: 56 - 63.
- Shi JR, Wang YZ, Fang ZD, 1992. The effect of triadimefon and triadimenol on the morphology and physiology of *Rhizoctonia cerealis* Vander Hoven. *Acta Phytopathologica Sinica*, 22(3): 205 - 209. [史建荣, 王裕中, 方中达, 1992. 三唑酮、三唑醇对小麦纹枯病形态和生理的影响. 植物病理学报, 22(3): 205 - 209]
- Tang F, Zhang CZ, Liang P, Shi XY, Gao XW, 2005. Partial purification of glutathione S-transferases by protein precipitators in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Entomol. Sin.*, 48(2): 172 - 178. [汤方, 张常忠, 梁沛, 史雪岩, 高希武, 2005. 蛋白质沉淀剂对棉铃虫谷胱甘肽 S-转移酶的部分纯化. 昆虫学报, 48(2): 172 - 178]
- Zhang ZR, 2004. Culture Cytology and Technology for Cell Culture. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 429 - 430. [张卓然, 2004. 培养细胞学与细胞培养技术. 上海: 上海科学技术出版社. 429 - 430]
- Zhang ZX, Xu HH, Cheng DM, Wu YL, Fan JF, 2000. Screening derivatives of spiro enol ether and testing its toxicity on *Spodoptera litura* cell with MTT method. *Journal of South China Agricultural University*,

- 21(3): 29 - 32. [张志祥, 徐汉虹, 程东美, 吴毓林, 范俊发, 2000. 利用 MTT 法以茛蒿素类似物对昆虫细胞毒力筛选及测定. 华南农业大学学报, 21(3): 29 - 32]
- Zhao HZ, Zhang ZX, Liao MD, Zhang JL, Xu HH, 2006. Insecticidal activities of propiconazole against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 49(2): 265 - 270. [赵海珍, 张志祥, 廖美德, 张竞立, 徐汉虹, 2006. 杀菌剂丙环唑对斜纹夜蛾的毒性. 昆虫学报, 49(2): 265 - 270]
- Zhao JP, Zhang HL, 2000. The estimation of NK cell activity to human red blood cells by modified LDH release assay. *Cancer Research and Clinic*, 12(3): 203 - 204. [赵俊萍, 张惠丽, 2000. LDH 释放法测定 NK 细胞活性对红细胞的影响. 肿瘤研究与临床, 12(3): 203 - 204]
- Zhao SH, 2001. *Plant Chemical Protect*. Beijing: China Agricultural Press. 122 - 123. [赵善欢, 2001. 植物化学保护. 北京: 中国农业出版社. 122 - 123]
- Zheng DH, Zuo J, Yang ZJ, Xia BL, Zhang XN, 2000. grp75 protects cells from injuries caused by glucose deprivation. *Acta Genetica Sinica*, 27(8): 666 - 671. [郑东航, 左俸, 杨增杰, 夏蓓莉, 张咸宁, 2000. grp75 对细胞缺糖损伤的保护作用. 遗传学报, 27(8): 666 - 671]
- Zhou QC, Hong HZ, Luo Q, Wan SQ, Wang H, Peng JX, 1998. Improvement of MTT method for determining the viability of insect cell. *Entomological Knowledge*, 35(3): 165 - 167. [周青春, 洪华珠, 罗勤, 万树青, 汪虹, 彭建新, 1998. 测定昆虫细胞存活或死亡的 MTT 方法的改进. 昆虫知识, 35(3): 165 - 167]

(责任编辑: 黄玲巧)