

单宁酸对甜菜夜蛾幼虫生长发育及酚氧化酶活性的抑制作用

刘 伟, 薛超彬, 张静静, 于金凤, 罗万春^①

(山东农业大学植物保护学院 农药毒理与应用技术省级重点实验室, 山东 泰安 271018)

摘要: 采用摄食毒力法研究了单宁酸对甜菜夜蛾 [*Spodoptera exigua* (Hübner)] 幼虫生长发育的影响及毒力作用, 并分析了单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制动力学。结果表明, 不同质量浓度单宁酸对甜菜夜蛾初孵幼虫具有较强的毒杀作用, 对 3 龄幼虫的体质量以及蛹质量、化蛹及羽化过程也均有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。随单宁酸质量浓度的提高或处理时间的延长, 甜菜夜蛾初孵幼虫的校正死亡率逐渐增大, 单宁酸的抑制生长效应逐渐增强, 处理第 7 天, 单宁酸对试虫的半致死浓度 (LC_{50}) 为 $3.7723 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 单宁酸对 3 龄幼虫体质量增长的抑制率最高 (35.09%); $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 单宁酸对蛹质量和羽化率的影响最明显。单宁酸能明显抑制甜菜夜蛾酚氧化酶的活力, 且随单宁酸浓度的提高, 酚氧化酶相对活力下降趋势明显趋缓, 单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶活性的半抑制浓度 (IC_{50}) 为 $0.2343 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 在加入不同浓度单宁酸的反应体系中, 酚氧化酶的活力与酶液量呈明显的线性关系; 不同浓度单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数图为 1 组横轴截距不变的直线; 另外, 单宁酸和半胱氨酸均可将多巴醌还原为多巴, 且还原量均随反应时间的延长而增加。研究结果说明, 单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用是可逆的, 为典型的非竞争性抑制剂, 抑制常数 (K_i) 为 $0.1938 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶二酚酶的抑制作用与 L-多巴氧化产物的还原有关。

关键词: 单宁酸; 甜菜夜蛾; 生长发育; 酚氧化酶; 毒杀活性; 抑制动力学

中图分类号: Q946.84; S482.3⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2010)01-0032-06

Inhibitory effect of tannic acid on growth, development and phenoloxidase activity of *Spodoptera exigua* larva LIU Wei, XUE Chao-bin, ZHANG Jing-jing, YU Jin-feng, LUO Wan-chun^① (Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2010, 19(1): 32-37

Abstract: Toxicity effect of tannic acid on growth and development of *Spodoptera exigua* (Hübner) larva were studied by feeding toxicity method, and its inhibition kinetics on phenoloxidase of *S. exigua* was also analyzed. The results show that tannic acid with different concentrations has a stronger toxicity effect on *S. exigua* newly hatched larva and also has an obvious inhibitory effect on weight of 3rd instar larva and pupa weight, pupation process and emergence process ($P < 0.05$). The corrected mortality of *S. exigua* newly hatched larva increases gradually with increasing of tannic acid concentration or prolonging of treatment time, and its inhibitory effect on larva growth enhances gradually. The median lethal concentration (LC_{50}) of tannic acid to the larva treated for 7 d is $3.7723 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The inhibition rate of $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ tannic acid to weight increment of 3rd instar larva of *S. exigua* is the highest with a value of 35.09%, and the inhibitory effects of $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ tannic acid on pupa weight and emergence rate are the most obvious. Tannic acid can obviously inhibit phenoloxidase activity of *S. exigua*, and downtrend of phenoloxidase relative activity is obviously slow with increasing of tannic acid concentration, and its hemi-inhibitory concentration (IC_{50}) on phenoloxidase activity of *S. exigua* is $0.2343 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. In reaction systems added tannic acid with different concentrations, there is obvious linear relationship between

收稿日期: 2009-09-08

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20070434006); 山东农业大学青年科技创新基金资助项目(200723612)

作者简介: 刘 伟(1983—), 女, 山东威海人, 硕士研究生, 主要从事昆虫毒理学及天然产物农药研究。

^①通信作者 E-mail: wcluo@sdau.edu.cn

phenoloxidase activity and enzyme solution volume. And Lineweaver-Burk double reciprocal graphs for inhibition of different concentrations of tannic acid to phenoloxidase activity of *S. exigua* are a group of linears with invariant intercept of abscissas. Otherwise, both of tannic acid and cysteine can reduce dopaquinone to dopa, and the reduction amount increases with prolonging of reaction time. It is suggested that the inhibitory effect of tannic acid on phenoloxidase activity of *S. exigua* is reversible, and tannic acid is a typical noncompetitive inhibitor with an inhibition constant (K_i) of $0.1938 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. And the inhibitory effect of tannic acid on phenoloxidase diphenolase of *S. exigua* is related to reduction of *L*-dopa oxidation products.

Key words: tannic acid; *Spodoptera exigua* (Hübner); growth and development; phenoloxidase; toxicity; inhibition kinetics

单宁酸广泛存在于自然界中,是虫瘦的化学成分之一,可以防御草食动物的侵袭,也是维管植物组织产生的生物化学物质之一,在生态学进程中发挥着重要作用。单宁酸是多种酶促反应的有效抑制剂,可抑制多种消化酶(如乙酰胆碱酯酶、糖苷转化酶和透明质酸酶等)的活性^[1];还可抑制酪氨酸酶的活性,引起昆虫表皮的不完全硬化和变黑^[2],但抑制机制尚不明确。在昆虫体壁形成过程中,酚氧化酶对昆虫表皮的硬化和黑化具有非常关键的作用,并在昆虫的生命活动过程中发挥着重要的免疫功能,因而,酚氧化酶是在昆虫体内起重要作用的氧化还原酶之一^[3],有望成为环境友好害虫控制剂的新靶标。

多年来,本项目组致力于以昆虫酚氧化酶为靶标的新型害虫控制剂的研究,已发现了一批活性较好的酚氧化酶抑制剂,并对其中活性较高的化合物的抑制机制进行了探讨,同时,还对部分化合物的结构与其活性的相关性(QSAR)进行了研究^[4-11]。

在前期大量筛选工作的基础上,作者以单宁酸为效应物,研究了该化合物对甜菜夜蛾[*Spodoptera exigua* (Hübner)]幼虫的摄食毒力作用及生长发育的影响,并开展了单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制动力学研究,旨在发现新型的昆虫酚氧化酶抑制剂并探讨其作用方式,为综合开发药用植物资源、寻找新的植物源杀虫剂提供理论基础,也为“环境友好害虫控制剂”的理论研究与实践提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用单宁酸(tannic acid)为Fluka公司产品,纯度为99%;供试甜菜夜蛾幼虫来源于山东泰安范镇试验地,在温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度60%~70%、

光照时间 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的养虫室内以新鲜的人工饲料饲养^[12]。

实验使用的主要仪器有CR22高速冷冻离心机(日本日立公司)和Multiskan MK3酶标仪(Thermo Electron Corporation);酶促反应底物为L-多巴(L-dopa,分析纯级,为Sigma公司产品);主要试剂有二甲基亚砜(DMSO)、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等,均为国产AR级。

1.2 方法

1.2.1 对初孵幼虫摄食毒力作用的测定方法 将新鲜的人工饲料切成薄片后置于不锈钢丝网罩内,分别置于质量浓度为1、2、4、8和 $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单宁酸溶液内浸渍20 s后取出,对照组则按同法改用清水浸渍饲料,用吸水纸吸去多余溶液,然后将饲料放置于养虫管内;处理前先分别称量甜菜夜蛾初孵幼虫的体质量,然后将幼虫挑入养虫管内置于养虫室内进行饲养,每处理20只试虫,各重复3次。每天记录试虫的死亡数,计算死亡率和校正死亡率,直到对照组试虫化蛹为止;于处理的第7天分别称量各组试虫的体质量,计算试虫体质量的增长抑制率。

1.2.2 对3龄幼虫生长发育影响的测定方法 按上述方法对处理组及对照组饲料进行前处理并置于养虫管内;处理前先分别称量甜菜夜蛾3龄幼虫的体质量,然后将3龄幼虫置于养虫管内饲养,每处理20只试虫,各重复3次。分别于饲养24和48 h后称量试虫的体质量,计算试虫的体质量增长抑制率;称量后再继续观察1周左右,统计试虫的化蛹及羽化情况,并计算化蛹率和羽化率。

1.2.3 对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制动力学实验 参照文献[13]和[14]的方法制备甜菜夜蛾酚氧化酶液,并测定甜菜夜蛾酚氧化酶的活力以及单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制效应,计算单宁酸对甜菜夜蛾

酚氧化酶的抑制常数。

参照 Andrawis 等^[15]的方法并略加改进,测定单宁酸和半胱氨酸对酚氧化酶二酚酶的反应进程。反应体系总体积为 200 μL ,包含抑制剂(0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 单宁酸或 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 半胱氨酸)6 μL 、底物溶液(5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ *L*-dopa)50 μL 及 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.5)100 μL ,双蒸水 14 μL ,混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min,然后加入 30 μL 酚氧化酶酶液,于 475 nm 处连续测定 300 s 内的光密度值,并绘制光密度值随时间的变化曲线。

1.3 数据处理

按以下公式计算试虫的校正死亡率和体质量增长抑制率:校正死亡率=[(处理组试虫死亡率-对照组试虫死亡率)/(1-对照组试虫死亡率)] \times 100%;体质量增长抑制率=[(对照组试虫体质量增加量-处理组试虫体质量增加量)/对照组试虫体质量增加量] \times 100%。

采用 DPS(V7.05 专业版)软件对实验数据进行处理,计算毒力回归方程及半致死浓度(LC_{50}),并采

用 GRAF4WIN 软件做图。

2 结果和分析

2.1 单宁酸对甜菜夜蛾初孵幼虫的摄食毒力作用

不同质量浓度单宁酸对甜菜夜蛾初孵幼虫的校正死亡率及体质量增长抑制率见表 1。由表 1 的实验数据可见,单宁酸对甜菜夜蛾初孵幼虫具有一定的毒杀作用但毒杀效应比较缓慢。随处理时间延长,不同质量浓度单宁酸对甜菜夜蛾初孵幼虫的毒力明显呈增高的趋势;相同处理时间,单宁酸质量浓度越高对试虫的毒力越大;处理第 7 天,单宁酸对甜菜夜蛾初孵幼虫的毒力回归方程为 $y=3.880 0+1.942 3x$,半致死浓度(LC_{50})为 3.772 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。除直接致死作用外,不同质量浓度单宁酸对残存的甜菜夜蛾初孵幼虫均具有明显的抑制生长的作用,且单宁酸质量浓度越高,抑制效应越强(表 1),但不同质量浓度处理组间甜菜夜蛾初孵幼虫的体质量增长抑制率差异不显著($P>0.05$)。

表 1 不同质量浓度单宁酸对甜菜夜蛾初孵幼虫的毒力比较($\bar{X}\pm SE$)^[1]

Table 1 Toxicity comparison of tannic acid with different concentrations on newly hatched larva of *Spodoptera exigua* (Hübner) ($\bar{X}\pm SE$)^[1]

质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	不同培养时间幼虫的校正死亡率/% Corrected mortality of larva at different culture times					体质量增长抑制率/% Inhibition rate to weight increment	
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d		11 d
1	3.33 \pm 6.15a	3.70 \pm 6.49a	6.73 \pm 6.19b	17.85 \pm 3.53bc	34.56 \pm 6.81b	68.06 \pm 19.46b	79.94 \pm 3.61a
2	3.33 \pm 6.15a	3.33 \pm 6.15a	3.70 \pm 6.49b	18.52 \pm 10.76c	38.36 \pm 5.08b	80.56 \pm 4.85ab	78.65 \pm 3.92a
4	0.00 \pm 0.00a	3.70 \pm 6.49a	10.07 \pm 0.56b	51.18 \pm 13.74b	80.09 \pm 12.24a	94.44 \pm 8.03ab	81.26 \pm 3.21a
8	3.03 \pm 5.85a	9.09 \pm 0.00a	31.99 \pm 2.28a	83.16 \pm 4.96a	96.63 \pm 6.18a	100.00 \pm 0.00a	85.23 \pm 2.17a
16	6.06 \pm 5.85a	9.39 \pm 0.30a	36.36 \pm 6.98a	85.86 \pm 3.20a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	91.36 \pm 2.22a

^[1] 同列中不同的小写字母表示经 *t* 检验差异显著($P<0.05$) Different small letters in same column indicate the significant difference by *t* test ($P<0.05$).

另外,在实验过程中还观察到,与对照组的试虫相比,各处理组试虫的生长严重迟滞,当对照组的试虫已生长至 5 龄时,处理组试虫仍处于 2 龄阶段;单宁酸对甜菜夜蛾初孵幼虫的致死毒力与迟滞生长毒力均呈正剂量效应。

2.2 单宁酸对甜菜夜蛾 3 龄幼虫生长发育的影响

2.2.1 对体质量的影响 不同质量浓度单宁酸对甜菜夜蛾 3 龄幼虫体质量的影响见表 2。由表 2 可见,与对照组相比,饲喂经不同质量浓度单宁酸处理后的人工饲料,对甜菜夜蛾 3 龄幼虫体质量的生长均有一定的抑制作用,当单宁酸质量浓度为 1、4 和 16 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,试虫取食 24 和 48 h 后的体质量均与对照组间存

在显著差异($P<0.05$)。由于受到试虫取食量等条件的限制,各处理组内试虫的体质量误差比较大。当单宁酸质量浓度为 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 3 龄幼虫体质量增长的抑制作用较为明显,抑制率最高,达到 35.09%。与单宁酸对甜菜夜蛾初孵幼虫体质量增长的影响效应相比,不同质量浓度单宁酸对甜菜夜蛾 3 龄幼虫体质量增长的抑制率明显偏低。

2.2.2 对化蛹及羽化的影响 不同质量浓度单宁酸对甜菜夜蛾的蛹质量、化蛹及羽化过程均有一定的抑制作用(表 3),且不同质量浓度处理组与对照组间均存在显著差异($P<0.05$)。当单宁酸的质量浓度为 16 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对甜菜叶蛾的蛹质量和羽化率的影响最

表 2 不同质量浓度单宁酸对甜菜夜蛾 3 龄幼虫体质量的影响 ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 2 Effect of tannic acid with different concentrations on weight of 3rd instar larva of *Spodoptera exigua* (Hübner) ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

质量浓度/g · L ⁻¹ Concentration	不同培养时间幼虫的体质量/g Larva weight at different culture times		体质量增加量/g Weight increment	体质量增长抑制率/% Inhibition rate to weight increment
	24 h	48 h		
1	0.067 5 ± 1.14bc	0.123 6 ± 1.90b	0.056 1	4.43
2	0.094 8 ± 0.78ab	0.151 1 ± 1.59ab	0.056 3	4.09
4	0.061 8 ± 0.53c	0.115 6 ± 1.42b	0.053 8	8.35
8	0.115 2 ± 1.23a	0.153 3 ± 1.08ab	0.038 1	35.09
16	0.077 9 ± 0.61bc	0.130 2 ± 2.18b	0.052 3	10.90
0 (CK)	0.124 5 ± 0.58a	0.183 2 ± 0.75a	0.058 7	-

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示经 *t* 检验差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters in same column indicate the significant difference by *t* test ($P < 0.05$).

表 3 不同质量浓度单宁酸对甜菜夜蛾化蛹及羽化的影响 ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 3 Effect of tannic acid with different concentrations on pupation and emergence of *Spodoptera exigua* (Hübner) ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

质量浓度/g · L ⁻¹ Concentration	蛹质量/g Pupa weight	化蛹率/% Pupation rate	羽化率/% Emergence rate
1	0.098 8 ± 0.02b	93.33 ± 6.15b	90.00 ± 0.00b
2	0.082 5 ± 0.14c	50.00 ± 3.33d	33.33 ± 5.39cd
4	0.072 5 ± 0.14d	56.67 ± 1.92d	36.67 ± 2.01c
8	0.082 7 ± 0.25c	30.00 ± 3.66e	23.33 ± 2.22cd
16	0.068 2 ± 0.17d	76.67 ± 2.22c	20.00 ± 0.00d
0 (CK)	0.105 8 ± 0.30a	100.00 ± 0.00a	96.67 ± 6.15a

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示经 *t* 检验差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters in same column indicate the significant difference by *t* test ($P < 0.05$).

明显, 试虫的蛹质量和羽化率分别仅为 0.068 2 g 和 20.00%, 均为最低。

2.3 单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制动力学分析

2.3.1 对酚氧化酶活力的影响 根据实验数据绘制的酚氧化酶相对活力与单宁酸浓度的关系图见图 1。结果表明, 在以 *L*-dopa 为底物时, 随着单宁酸浓度的提高, 酚氧化酶的相对活力逐渐降低。与对照相比 (酚氧化酶相对活力 100%), 当单宁酸浓度为 0.05 mmol · L⁻¹ 时, 酚氧化酶的相对活力降幅最大, 与对照相差 30.08%; 当单宁酸浓度提高至 0.20 mmol · L⁻¹ 时, 酚氧化酶的相对活力与对照相差 49.97%; 当单宁酸浓度提高至 0.40 mmol · L⁻¹ 时, 酚氧化酶的相对活力与对照相差 55.29%。依据图 1 曲线的变化趋势可以判定, 单宁酸的浓度高于 0.10 mmol · L⁻¹, 随单宁酸浓度的继续提高, 试虫酚氧化酶的相对活力虽然持续下降, 但下降趋势明显趋缓。根据单宁酸浓度与酚氧化酶相对活力关系曲线推算的回归方程计算出单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶的半抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.234 3 mmol · L⁻¹。

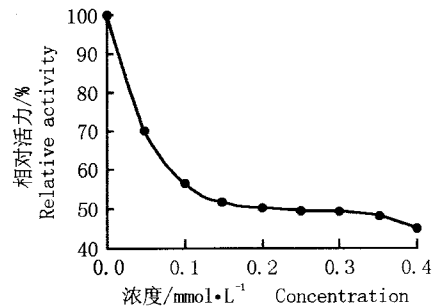


图 1 不同浓度单宁酸与甜菜夜蛾酚氧化酶相对活力的关系曲线
Fig. 1 Relationship curve of different concentrations of tannic acid with relative activity of phenoloxidase of *Spodoptera exigua* (Hübner)

2.3.2 对酚氧化酶的抑制效应分析 在底物浓度不变的条件下 (1 mmol · L⁻¹ *L*-dopa), 在反应体系中加入不同浓度单宁酸, 甜菜夜蛾酚氧化酶的活力与酶液量间的关系见图 2。由图 2 可见, 加入不同浓度单宁酸后, 酚氧化酶的活力均随酶液量的增加而增大, 且酶活力与酶液量呈明显的线性关系。随着单宁酸浓度的提高, 直线的斜率逐渐降低, 表明单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶活力的抑制作用是可逆的。

2.3.3 对酚氧化酶的抑制类型和抑制常数分析 以 *L*-dopa 浓度的倒数为自变量、酶反应速率的倒数为因变量绘制单宁酸对酚氧化酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数图 (图 3), 结果显示, 不同浓度单宁酸对酚氧化酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数图为 1 组横轴截距不变的直线, 表明在酚氧化酶反应过程中单宁酸不会改变该酶促反应的米氏常数 (K_m), 仅影响酶促反应的最大反应速率 (v_{max})。图 3 中, v_{max} 值随着单宁酸浓度的提高而减小, 说明单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用为非竞争性抑制。

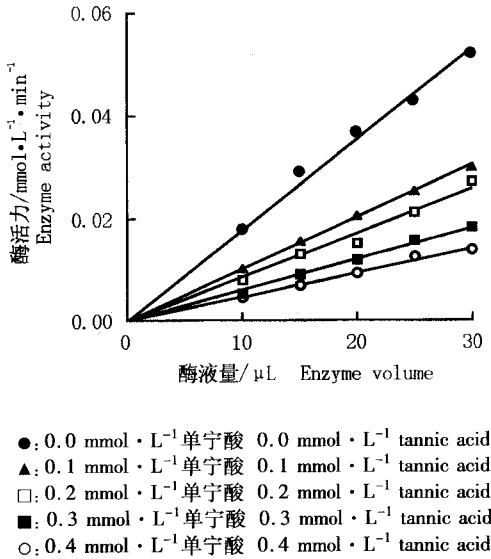


图2 在不同浓度单宁酸存在条件下甜菜夜蛾酚氧化酶活力与酶液量的关系(反应底物为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} L\text{-dopa}$)
 Fig. 2 Relationship between activity and volume of phenoloxidase of *Spodoptera exigua* (Hübner) under condition of different concentrations of tannic acid (reaction substrate $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} L\text{-dopa}$)

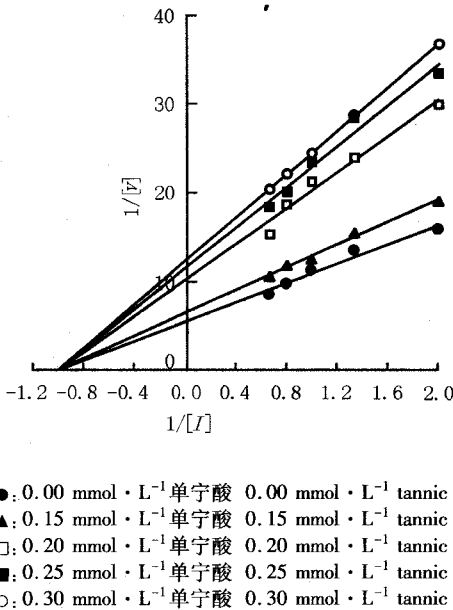
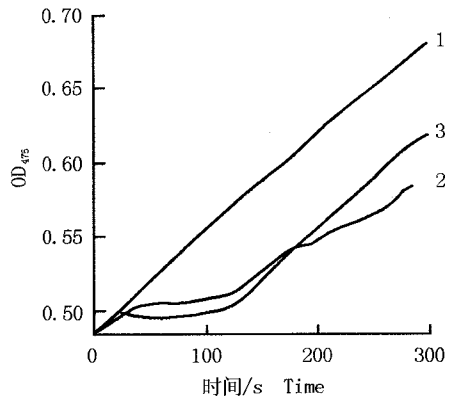


图3 不同浓度单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶活性抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数图
 Fig. 3 Lineweaver-Burk double reciprocal graph for inhibition of tannic acid with different concentrations to phenoloxidase activity of *Spodoptera exigua* (Hübner)

以不同浓度单宁酸存在条件下甜菜夜蛾酚氧化酶的酶促反应速率的倒数($1/v_{\text{max}}$)分别对单宁酸浓度

($0.00 \sim 0.30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)做图,结果为1条直线,根据该直线的斜率可以求得单宁酸对甜菜叶蛾酚氧化酶的抑制常数(K_i)为 $0.1938 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.4 对酚氧化酶二酚酶反应进程的影响 半胱氨酸等还原剂可将酚氧化酶氧化 *L-dopa* 的产物多巴醌还原为多巴,且通过测定溶液吸光度的变化可检测多巴的生成量。以 *L-dopa* 为底物,分别测定无抑制剂以及添加抑制剂单宁酸或半胱氨酸后溶液的吸光度,并绘制不同条件下甜菜叶蛾酚氧化酶二酚酶的反应进程曲线,结果见图4。结果表明,单宁酸和半胱氨酸均可将多巴醌还原为多巴,且还原量均随反应持续时间的延长而增加,表明单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶二酚酶的抑制作用与 *L-dopa* 氧化产物的还原有关。



1: 对照 Control; 2: 单宁酸 Tannic acid; 3: 半胱氨酸 Cysteine.

图4 单宁酸和半胱氨酸对甜菜夜蛾酚氧化酶二酚酶反应进程的影响
 Fig. 4 Effects of tannic acid and cysteine on reaction process of phenoloxidase diphenolase of *Spodoptera exigua* (Hübner)

3 讨论和结论

酚氧化酶催化完成的醌柔化作用可以促进昆虫表皮的硬化与黑化,这个过程对于具有“外骨骼”的昆虫的生命活动至关重要^[16]。在昆虫变态的各个阶段,譬如由新生卵发育为成熟卵、幼虫蜕皮、幼虫化蛹以及蛹羽化为成虫后的体壁及其附肢(如翅、足等)的黑化和硬化过程都与酚氧化酶的作用息息相关。因此,可将酚氧化酶作为新型害虫控制剂的重要靶标,即通过抑制该酶的活性和作用过程,阻止或降低昆虫的自我完善与保护功能,减弱基于保护作用的免疫反应,使有害昆虫的生命力“弱化”或死亡,致使昆虫赖以支撑躯体的体壁“软化”畸形或丧失生命能力,从而

达到合理控制害虫的目的。

研究结果显示,单宁酸对甜菜夜蛾具有一定的“毒杀”作用,该作用是多方面的,主要包括直接“杀死”、明显抑制幼虫化蛹及蛹的羽化过程、抑制幼虫体质量增长等方面,且单宁酸的作用靶标为酚氧化酶。由于甜菜夜蛾体内用于体壁黑化和硬化(此过程直接决定试虫的“蜕皮”,即摆脱限制生长的束缚而正常长大和变态)的酚氧化酶活性被单宁酸抑制,使试虫不能顺利完成正常生命过程中的蜕皮变态过程,最终导致试虫生长发育受限、不能正常蜕皮化蛹直至死亡。单宁酸对甜菜夜蛾的抑制类型表现为可逆的非竞争性抑制作用,表明单宁酸既可以与游离酶(E)结合,也可以与结合酶(ES)结合,抑制剂和酶分子的结合与底物分子和酶分子的结合是相互独立的。此外,单宁酸对甜菜夜蛾酚氧化酶二酚酶的抑制作用与多巴氧化产物的还原有关。

当前,“环境友好害虫控制剂”逐渐为公众所接受,研究和开发此类“农药”已经成为植保科技工作者争先抢占的制高点。在研发“环境友好害虫控制剂”的众多途径中,通过控制昆虫的酚氧化酶活性控制害虫的代谢途径、干扰或阻断害虫一部分或全部的生命过程,是新型害虫控制剂的重要研发理念。单宁酸存在于自然界中,对环境不会造成危害,若能将单宁酸及其衍生物作为开发新型农药的骨架结构,并以此骨架合成系列化合物,运用构效关系(QSAR)设计出全新的能有效控制农田害虫的新型农药,是研发新型农药的重要途径。

参考文献:

- [1] 李 斌. 单宁——一种植物的次生代谢产物[J]. 生物学教学, 2002, 27(12): 36-37.
- [2] Kubo I. New concept to search for alternate insect control agents from plants[M]//Rai M, Carpinella M C. Advances in Phytomedicine (Vol. 3): Naturally Occurring Bioactive Compounds. Amsterdam: Elsevier, 2006: 61-80.
- [3] 罗克斯坦. 昆虫生物化学[M]. 李绍文,译. 北京: 科学出版社, 1988: 151-153.
- [4] 谢桂英, 罗万春, 马 琛. 天然源化合物曲酸对小菜蛾酚氧化酶抑制作用研究初报[J]. 农药学报, 2003, 5(1): 68-72.
- [5] 高兴祥, 罗万春, 于天丛, 等. 几种苯甲酸类化合物对甜菜夜蛾多酚氧化酶活性的影响[J]. 农药学报, 2004, 6(1): 26-30.
- [6] Wang S D, Luo W C, Gao X X, et al. Inhibitory effects of kojic acid on phenoloxidase of diamondback moth *Plutella xylostella* [J]. Agricultural Sciences in China, 2004, 3(12): 923-930.
- [7] 王树栋, 罗万春, 高兴祥, 等. 4-己基间苯二酚对小菜蛾酚氧化酶抑制作用研究[J]. 农药学报, 2004, 6(3): 31-36.
- [8] 罗万春, 高兴祥, 于天丛, 等. 栝皮酮对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用[J]. 昆虫学报, 2005, 48(1): 36-41.
- [9] Wang S D, Luo W C, Xu S J, et al. Inhibitory effects of 4-dodecylresorcinol on the phenoloxidase of the diamondback moth *Pulltella xylostella* (L.) (Lepidoptera Plutellidae) [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2005, 82(1): 52-58.
- [10] Xue C B, Zhang L, Luo W C, et al. 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid and their derivatives as phenoloxidase inhibitors[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2007, 15(5): 2006-2015.
- [11] Xue C B, Ding Q, Luo W C, et al. 2D-QSAR studies of benzaldehyde, benzoic acid, benzaldehyde thiosemicarbazone, and their derivatives as insect phenoloxidase inhibitors [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2008, 10(3): 275-281.
- [12] 慕 卫, 吴孔明, 梁革梅, 等. 苜蓿夜蛾人工饲养技术[J]. 农药学报, 2002, 3(4): 93-96.
- [13] 刘 伟, 肖 婷, 杜 磊, 等. 牛耳枫提取物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用[J]. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3720-3725.
- [14] 肖 婷, 刘守柱, 薛超彬, 等. 紫外分光光度计法与酶标仪微量法测定酚氧化酶蛋白含量及活力的比较[J]. 昆虫知识, 2008, 45(2): 306-309.
- [15] Andrawis A, Kahn V. Effect of methimazole on the activity of mushroom tyrosinase [J]. Biochemical Journal, 1986, 235(1): 91-96.
- [16] 罗万春, 薛超彬. 昆虫酚氧化酶及其抑制剂[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 13-14.