

黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的毒力及其对几种酶活力的影响

刘雨晴^{1,2}, 薛明^{1,①}, 周方园¹, 徐华强¹

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2. 河南省科学院天然产物重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 采用酸水溶液提取法获得黄荆(*Vitex negundo* L.)种子总生物碱粗品,通过生物测定和生化分析方法研究了黄荆种子总生物碱对棉蚜(*Aphis gossypii* Glover)无翅成蚜的生物活性。结果显示:黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的触杀毒力较高,对单头棉蚜无翅成蚜的 LD_{50} 为0.073 μg ;用质量浓度0.500、1.000、2.000、4.000和8.000 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 总生物碱处理棉蚜无翅成蚜后24、48和72 h的忌避中浓度(AFC_{50})分别为1.256、1.720和3.923 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,具有一定的忌避和持续控制作用;用总生物碱 LD_{30} 剂量(每头0.045 μg)处理棉蚜无翅成蚜,其存活时间较对照缩短7 d,单头雌成蚜的繁殖力较对照降低了30.43%;单头棉蚜无翅成蚜每天的平均排蜜频率和排蜜量分别较对照减少了4.26滴和27.10 μg ,差异达显著水平。在离体条件下,黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的活力有显著的抑制作用, IC_{50} 分别为0.778、1.901和4.216 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;但对多酚氧化酶的活力则有明显的激活作用,激活程度呈明显的量效关系。用总生物碱 LD_{50} 剂量(每头0.073 μg)处理棉蚜无翅成蚜后3、6、12和24 h,成蚜体内羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的活力显著低于对照,而体内的多酚氧化酶活力则显著高于对照。研究表明:黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的杀虫作用机制与其对几种酶活力的影响效应相关。

关键词: 黄荆种子; 总生物碱; 棉蚜; 毒力; 酶活力; 杀虫机制

中图分类号: Q949.96; S435.622⁺.1; S482.3⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)03-0043-08

Toxicity of total alkaloids from *Vitex negundo* seeds against apterous adults of *Aphis gossypii* and its effect on activity of some enzymes LIU Yu-qing^{1,2}, XUE Ming^{1,①}, ZHOU Fang-yuan¹, XU Hua-qiang¹ (1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Key Laboratory of Natural Products of He'nan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(3): 43-50

Abstract: Crude total alkaloids were obtained from *Vitex negundo* L. seeds by acid solution extraction method, and its biological activity against apterous adults of *Aphis gossypii* Glover was determined by bioassay and biochemical analysis methods. The results show that contact toxicity of total alkaloids against apterous adults of *A. gossypii* is relatively high and LD_{50} to per apterous adult is 0.073 μg . After treatment of 0.500, 1.000, 2.000, 4.000 and 8.000 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ total alkaloids against apterous adults for 24, 48 and 72 h, AFC_{50} is 1.256, 1.720 and 3.923 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, showing that total alkaloids have a certain deterrent and sustainable control effects. Compared with the control, the survival time of apterous adults treated by total alkaloids at the dose of LD_{30} (0.045 μg per apterous adult) is shorted by 7 d, and the fertility per female apterous adult is reduced by 30.43%. And averages of honeydew excretion frequency and amount per day of per apterous adult are reduced by 4.26 drops and 27.10 μg , respectively, and the difference with the control reaches the significant level. Under *in vitro* condition, inhibition of total alkaloids on activities of carboxylesterase (CarE), acetylcholinesterase (AChE) and glutathione-S-transferase (GST) from apterous adults is significant and IC_{50} is 0.778, 1.901 and 4.216

收稿日期: 2010-09-07

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2006D13); 山东省教育厅资助项目(J04C06)

作者简介: 刘雨晴(1981—),女,山东巨野人,博士研究生,主要从事害虫综合治理方面的研究。

①通信作者 E-mail: xueming@sdau.edu.cn

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, but total alkaloids have an obvious activation on polyphenol oxidase (PPO) with an obvious dose-effect relationship. After treatment of total alkaloids for 3, 6, 12 and 24 h at the dose of LD_{50} ($0.073 \mu\text{g}$ per apterous adult), activities of CarE, AchE and GST of apterous adults *in vivo* are significantly lower but PPO activity is significantly higher than those of the control. It is suggested that the insecticidal action mechanism of total alkaloids from *V. negundo* seeds against apterous adults of *A. gossypii* relates to its effect on some enzyme activities.

Key words: *Vitex negundo* L. seed; total alkaloids; *Aphis gossypii* Glover; toxicity; enzyme activity; action mechanism

植物体内的生物碱不仅可直接利用,还可作为仿生合成新型害虫控制剂的先导化合物。以烟碱为先导化合物开发的氯化烟酰胺类杀虫剂,因具有作用方式新颖、高效、低毒和杀虫范围广谱等特点,倍受国内外重视,现已成为应用最广泛的小型昆虫防治剂^[1]。

黄荆(*Vitex negundo* L.)为牡荆属(*Vitex* L.)落叶灌木,在传统医药中应用广泛,具有抗菌消炎、镇痛和抗氧化等作用^[2-4]。作者所在课题组的前期研究结果已经明确黄荆提取物对一些储粮害虫和蚜虫等农业害虫具有明显的杀虫活性^[5-7]。生物碱是黄荆所含的次生代谢产物之一^[8],目前,有关黄荆的研究主要集中在黄荆提取物及其萜烯类成分对农业害虫的防治方面^[9],而黄荆种子中生物碱对农业害虫的作用尚未见报道。

为了明确黄荆种子总生物碱对农业害虫的生物活性及其毒力机制,作者以棉蚜(*Aphis gossypii* Glover)无翅成蚜为试虫,系统研究了黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的杀虫作用,并据此探讨其作用机制,为黄荆的综合开发利用提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试黄荆种子于2007年采自山东泰山的山坡,原植物由山东农业大学林学院李建教授鉴定。种子于室内阴干后,用WK-1600A型中药粉碎机(山东省青州市精诚医药装备制造有限公司)粉碎,过40目铜筛,备用。

供试棉蚜无翅成蚜采自山东泰安郊区的棉田,以传统棉花营养液^[10]培养的‘丰抗6号’棉苗进行饲养,置于温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度60%~75%、光照时间 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的LRH-250-G恒温光照培养箱(广东省医疗器械厂)内连续饲养。

实验中使用的碘化硫代乙酰胆碱(ATC)、谷胱甘

肽、毒扁豆碱、固蓝B盐和牛血清蛋白等均为美国Sigma公司产品;溴甲酚蓝、邻苯二酚、 α -乙酸萘酯、十二烷基硫酸钠(SDS)、1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、5,5-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB)和考马斯亮蓝等均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总生物碱提取方法 参照文献[11]的酸水溶液提取法提取总生物碱。按质量体积比1:3的比例将黄荆种子粉末和甲醇混匀,于 25°C 恒温条件下冷浸72 h,期间振荡多次,然后将混合物抽滤,滤液旋转蒸发除去多余溶剂,得到黄荆种子的甲醇提取物浸膏^[12]。加入4倍体积的体积分数5% HCl溶液,搅拌后静止,待明显分层后收集酸水层;残渣按上述方法再重复处理2次,合并3次萃取的酸水层,抽滤后按滤液体积加入1/3体积的三氯甲烷进行萃取,弃去三氯甲烷层,再重复萃取2次;在经过萃取处理的滤液中加入3倍体积的三氯甲烷并充分振摇,迅速用氨水调节至pH 10~pH 11,振摇3 min,静置,分层后取三氯甲烷层,如此反复处理5~6次,合并三氯甲烷层,旋转蒸发后得到总生物碱粗品。

1.2.2 生物活性测定方法 触杀毒力测定:参照文献[13]的毛细管点滴法进行触杀毒力测定。以丙酮(含质量体积分数0.2%苏丹红和体积分数1%蒸馏水)为溶剂,将总生物碱粗品分别稀释成质量浓度0.625、1.250、2.500、5.000和10.000 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的总生物碱溶液。选取大小一致的棉蚜无翅成蚜,用毛细管点滴器点滴总生物碱溶液,每头成蚜 $0.0338 \mu\text{L}$;对照(CK)组则点滴等体积丙酮;每处理15头试虫,重复5次。在塑料盒(直径6 cm、高5 cm)内装入用湿棉球包住叶柄的棉花叶片,将处理后的试虫用毛笔挑入盒内,置于温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(75 ± 5)%、光照时间 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的光照培养箱内培养,24 h后检查存活和死亡试虫的数量。所得数据用Finney机率分析法^[13]进行处理,求得毒力回归方程和 LD_{50} 以及

LD_{30} (使棉蚜无翅成蚜死亡 50% 和 30% 的总生物碱质量)。

忌避毒力测定:采用周琼等^[14]的方法并加以改进。用丙酮将总生物碱粗品配制质量浓度 0.500、1.000、2.000、4.000 和 8.000 $g \cdot L^{-1}$ 的供试溶液;将 10 mL 质量体积分数 1% 的琼脂倒入培养皿(直径 12 cm)中央,冷却后待用;棉花叶片剪成直径 4 cm 的圆片,正面朝下紧贴于琼脂上;以叶背主叶脉为分界线,一侧用总生物碱溶液 10 μL 均匀涂布,作为处理区;另一侧用丙酮 10 μL 涂布,作为对照(CK)区;待叶片晾干成膜后,将成蚜用毛笔轻轻挑到叶背中脉上,每一培养皿 16 头试虫,用保鲜膜封住皿口,用昆虫针刺上多个通气孔后,置于温度(25±1) °C、相对湿度(75±5)%、光照时间 14 $h \cdot d^{-1}$ 的光照培养箱内培养。每一培养皿视为 1 次重复,每处理重复 6 次。分别于 24、48 和 72 h 后检查叶背处理区和对照区试虫的栖息数,计算忌避率及忌避中浓度(AFC_{50})。忌避率=[(对照区试虫数-处理区试虫数)/对照区试虫数]×100%。

对成蚜存活率和繁殖力影响的测定:采用改进的叶子圆片法^[15]饲养。以上述实验确定的总生物碱 LD_{30} 剂量(每头 0.045 μg)点滴成蚜,对照组则点滴 0.045 μg 丙酮。在培养皿中加入 10 mL 质量体积分数 1% 琼脂,冷却后将棉花叶片正面朝下紧贴在琼脂上,将试虫用毛笔轻轻挑到棉花叶片的背面,单头饲养,用保鲜膜封住培养皿,刺上多个通气孔,置于温度(25±1) °C、相对湿度(75±5)%、光照时间 14 $h \cdot d^{-1}$ 的光照培养箱内培养。处理和对照均重复 20 次。每天检查死亡和存活的试虫数和新产的若蚜数,并及时将新产的若蚜去除,直到成蚜全部死亡为止。

对成蚜蜜露分泌影响的测定:棉蚜无翅成蚜蜜露分泌包含排蜜量、蜜滴质量和排蜜频率 3 个指标。排蜜量测定参照杨益众等^[16]的方法并略加改进。以 LD_{30} 剂量(每头 0.045 μg)点滴成蚜,对照组则点滴 0.045 μg 丙酮。在一次性塑料杯(直径 6 cm,体积 100 mL)中加入质量体积分数 1% 琼脂 15 mL,凝固后,将直径 4 cm 的棉花叶圆片正面朝下贴于琼脂上,将成蚜接在叶圆片上,每杯 5 头。待试虫固定后,检查叶背面固定的试虫数,处理和对照各重复 20 次。根据试虫的排蜜行为,将塑料杯倒置在已知质量的保鲜膜上,置于温度(25±1) °C、相对湿度(75±5)%、光照时间 14 $h \cdot d^{-1}$ 的光照培养箱内培养。24 h 后用

FA1004 电子天平(上海迈哲电子科技有限公司)称取保鲜膜质量,计算排蜜量。

蜜滴质量测定参照文献[16]的方法并略加改进。在前述排蜜量测定的基础上 1 h 旋转 1 次杯子,旋转角度每次不超过 30°,以避免蜜滴重叠。12 h 后统计保鲜膜上的蜜滴数并称取质量,计算每滴蜜露的质量。

排蜜频率的测定参照孟玲等^[17]的方法并略加改进。试虫前处理同排蜜量的测定,将直径 15 cm 的滤纸沿半径剪 1 条中缝,用质量体积分数 0.2% 溴甲酚蓝无水乙醇溶液处理并阴干后套在叶片背面接有成蚜的棉株茎基部,每处理 5 头成蚜,各重复 20 次;置于温度(25±1) °C、相对湿度(75±5)%、光照时间 14 $h \cdot d^{-1}$ 的光照培养箱内培养。12 h 更换 1 次滤纸,共观察 24 h,蜜滴落点处滤纸由黄变蓝,记录滤纸上的蓝点数(即蜜滴数)和棉花叶片背面的成蚜数,计算单头成蚜每天的排蜜频率。

1.2.3 对棉蚜无翅成蚜离体酶活力影响的测定 乙酰胆碱酯酶比活力的测定:将 400 头棉蚜无翅成蚜置于 2 mL 磷酸缓冲液(0.1 $mol \cdot L^{-1}$, pH 7.5)中,于冰浴中用玻璃匀浆器匀浆,然后用 CR22 高速冷冻离心机(日本日立公司)于 4 °C、4 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min,上清液即为供试酶液。用丙酮将总生物碱粗品分别配制质量浓度 0.312 5、0.625、1.250、2.500 和 5.000 $g \cdot L^{-1}$ 的溶液待用;参照 Ellman 等^[18]的方法测定乙酰胆碱酯酶活性。反应体系总体积为 3.0 mL,包括酶液 0.2 mL[对照以 0.2 mL 磷酸缓冲液(0.1 $mol \cdot L^{-1}$, pH 7.5)代替酶液]、ATC-DTNB 混合溶液(体积比 1:2)0.1 mL、总生物碱溶液 0.1 mL 以及磷酸缓冲液(0.1 $mol \cdot L^{-1}$, pH 7.5)2.1 mL,于 27 °C 水浴反应 15 min,加入 1 $mmol \cdot L^{-1}$ 毒扁豆碱 0.5 mL 终止反应,混匀后用 UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)于波长 412 nm 处测 OD 值,重复 3 次。以 1 min 内 1 mg 蛋白质水解碘化硫代乙酰胆碱的量作为乙酰胆碱酯酶的比活力。

多酚氧化酶活力的测定:将 400 头成蚜置于 2 mL 磷酸缓冲液(0.2 $mol \cdot L^{-1}$, pH 6.8)中,匀浆后于 6 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 30 min,上清液即为供试酶液。用丙酮将总生物碱粗品分别配制质量浓度 0.500、1.000、2.000、4.000 和 8.000 $g \cdot L^{-1}$ 的溶液待用。以 100 $mmol \cdot L^{-1}$ 邻苯二酚 1.5 mL 为底物,加入磷酸缓冲液(0.2 $mol \cdot L^{-1}$, pH 6.8)1.3 mL 和总生物碱溶液

0.1 mL,于30 ℃水浴处理30 min,加入酶液0.1 mL [对照以0.1 mL磷酸缓冲液(0.2 mol·L⁻¹,pH 6.8)代替酶液],混匀后立即于波长420 nm处测定2 min内OD值的变化,重复3次。以1 min内1 mg蛋白质使OD值改变0.001所需的酶量为1个酶活力单位。

羧酸酯酶比活力和谷胱甘肽-S-转移酶活力的测定:将400头成蚜置于2 mL磷酸缓冲液(0.04 mol·L⁻¹,pH 7.0)中,匀浆后于4 000 r·min⁻¹离心20 min。上清液为谷胱甘肽-S-转移酶供试酶液,将上清液稀释500倍作为羧酸酯酶供试酶液。

参照文献[19]的方法测定羧酸酯酶的比活力。用丙酮将总生物碱粗品分别配制成质量浓度0.150、0.300、0.600、1.200和2.400 g·L⁻¹的溶液。反应体系包含0.3 mmol·L⁻¹α-乙酸萘酯(含1 μmol·L⁻¹毒扁豆碱)5 mL,于25 ℃温育5 min;加入总生物碱溶液0.1 mL和酶液0.1 mL[对照以0.1 mL磷酸缓冲液(0.04 mol·L⁻¹,pH 7.0)代替酶液],于30 ℃水浴中振荡处理30 min,再加入显色剂(1%固蓝B盐和5% SDS按体积比2:5混合而成)1.0 mL,混匀后于室温下放置30 min,待颜色稳定后,于波长600 nm处测定OD值,重复3次。以1 min内1 mg蛋白质水解α-乙酸萘酯的量作为羧酸酯酶的比活力。

参照文献[20]的方法测定谷胱甘肽-S-转移酶的活力。用丙酮将总生物碱粗品分别配制成质量浓度1.000、2.000、4.000、8.000和16.000 g·L⁻¹的溶液待用。反应体系包含磷酸缓冲液(66 mmol·L⁻¹,pH 7.0)2.4 mL、50 mmol·L⁻¹谷胱甘肽0.3 mL、0.03 mol·L⁻¹CDNB 0.1 mL、酶液0.2 mL[对照以0.2 mL磷酸缓冲液(66 mmol·L⁻¹,pH 7.0)代替酶液]和总生物碱溶液0.1 mL,立即测定波长340 nm处3 min内OD值的变化,重复3次。以1 min内1 mg蛋白质使OD值改变0.001所需的酶量为1个酶活力单位。

上述实验中均采用考马斯亮蓝法^[21]测定可溶性蛋白质含量。

1.2.4 对棉蚜无翅成蚜体内酶活力影响的测定 选择成蚜200头,以上述实验确定的总生物碱触杀LD₅₀剂量(每头0.073 μg)点滴,分别在处理后3、6、12和24 h按照前述方法制备酶源,重复3次。按照上述方法测定成蚜体内乙酰胆碱酯酶、多酚氧化酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的活力。

1.3 数据处理与分析

用Finney机率分析法和SPSS 16.0软件进行统计分析;对实验数据进行t检验;用LSD法分析差异显著性。

2 结果和分析

2.1 黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的触杀毒力

根据不同质量浓度黄荆种子总生物碱溶液对棉蚜无翅成蚜的触杀毒力,以总生物碱质量的对数为横坐标(x)、棉蚜无翅成蚜死亡率的机率值为纵坐标(y),得到线性回归方程 $y=2.80+(2.46\pm 0.15)x$,黄荆种子总生物碱对单头棉蚜无翅成蚜的LD₅₀为0.073 μg,95%置信区间为0.065~0.081 μg。苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)总生物碱喷雾处理棉蚜无翅成蚜24 h的LC₅₀为0.984 g·L⁻¹^[22]。相比较而言,黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的触杀毒力较为显著。

2.2 黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的忌避毒力

不同处理时间黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的忌避毒力见表1。由表1可见:用不同质量浓度黄荆种子总生物碱溶液处理棉蚜无翅成蚜后24、48和72 h的忌避中浓度(AFC₅₀)分别为1.256、1.720和3.923 g·L⁻¹。显示黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜具有一定的忌避作用和持续控制作用。

2.3 黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜存活率和繁殖力的影响

以黄荆种子总生物碱LD₃₀剂量(每头0.045 μg)处理棉蚜无翅成蚜,对照组与处理组成蚜存活率的比

表1 黄荆种子总生物碱溶液对棉蚜无翅成蚜忌避毒力的分析

Table 1 Analysis of deterrent toxicity of total alkaloids solution from *Vitex negundo* L. seeds against apterous adults of *Aphis gossypii* Glover

处理时间/h Treatment time	AFC ₅₀ /g·L ⁻¹	回归方程 Regression equation	95%置信区间/g·L ⁻¹ 95% confidence limit	R
24	1.256	$y=-4.66+(1.50\pm 0.13)x$	1.116-1.413	0.928
48	1.720	$y=-5.31+(1.64\pm 0.13)x$	1.494-1.971	0.944
72	3.923	$y=-4.96+(1.38\pm 0.13)x$	3.024-5.266	0.923

较见图1。由图1可见:经黄荆种子总生物碱 LD_{30} 剂量处理的成蚜,存活时间较对照缩短7 d;而在相同的处理时间内,处理组的存活率逐渐降低且明显低于对照。

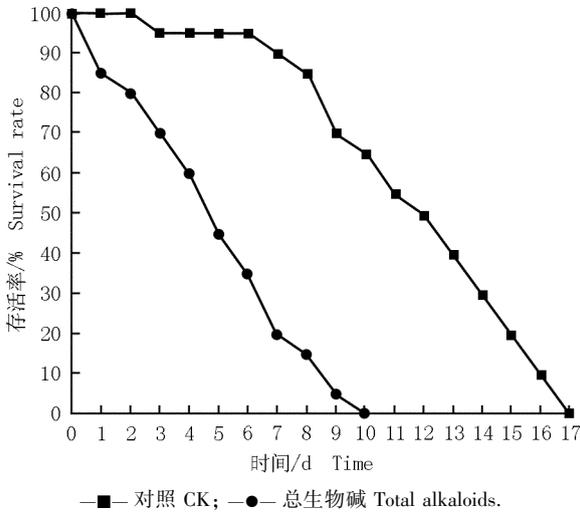


图1 黄荆种子总生物碱 LD_{30} 剂量(每头 $0.045 \mu\text{g}$)对棉蚜无翅成蚜存活率的影响
 Fig. 1 Effect of total alkaloids at the dose of LD_{30} ($0.045 \mu\text{g}$ per apterous adult) from *Vitex negundo* L. seeds on survival rate of apterous adults of *Aphis gossypii* Glover

表2 黄荆种子总生物碱溶液对棉蚜无翅成蚜3种离体酶活力的抑制效应
 Table 2 Inhibition effect of total alkaloids solution from *Vitex negundo* L. seeds on activity of three enzymes *in vitro* from apterous adults of *Aphis gossypii* Glover

酶 Enzyme	$IC_{50}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回归方程 Regression equation	95% 置信区间/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 95% confidence limit	R
羧酸酯酶 Carboxylesterase	0.778	$y = -5.19 + (1.79 \pm 0.16)x$	0.665-0.920	0.970
乙酰胆碱酯酶 Acetylcholinesterase	1.901	$y = -4.77 + (1.46 \pm 0.15)x$	1.573-2.359	0.930
谷胱甘肽-S-转移酶 Glutathione-S-transferase	4.216	$y = -6.40 + (1.77 \pm 0.16)x$	3.595-4.955	0.928

活力的抑制作用最强,抑制中浓度(IC_{50})仅为 $0.778 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;对乙酰胆碱酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶活力抑制作用的 IC_{50} 分别为 1.901 和 $4.216 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜离体多酚氧化酶活力的效应见表3。由表3可见:与对照相比较, $0.500 \sim 8.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 总生物碱溶液对成蚜离体多酚氧化酶活力有明显的激活作用,激活程度有明显的剂量效应,即:随着黄荆种子总生物碱溶液质量浓度的提高,多酚氧化酶的活力逐渐增强。

2.6 黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜体内酶活力的影响

以黄荆种子总生物碱 LD_{50} 剂量(每头 $0.073 \mu\text{g}$)

此外,黄荆种子总生物碱 LD_{30} 剂量能显著抑制雌成蚜的繁殖力。处理组单头雌成蚜繁殖力为 11.2 头,对照组则为 16.1 头,处理组单头雌成蚜的繁殖力较对照组减少了 30.43% 。

2.4 黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜蜜露分泌的影响

以黄荆种子总生物碱 LD_{30} 剂量(每头 $0.045 \mu\text{g}$)处理棉蚜无翅成蚜,单头成蚜每天的平均排蜜量和平均排蜜频率分别为 $(113.14 \pm 6.93) \mu\text{g}$ 和 (12.18 ± 0.51) 滴,而对照组单头成蚜每天的平均排蜜量和平均排蜜频率分别为 $(140.24 \pm 8.11) \mu\text{g}$ 和 (16.44 ± 0.56) 滴;处理组单头成蚜每天的平均排蜜量和平均排蜜频率分别较对照组减少了 $27.10 \mu\text{g}$ 和 4.26 滴,差异达到显著水平。处理组成蚜的每滴蜜滴平均质量略低于对照组,其中处理组为 $(6.74 \pm 0.18) \mu\text{g}$,对照组为 $(7.33 \pm 0.15) \mu\text{g}$,二者差异不显著。

2.5 黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜离体酶活力的影响

黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜离体羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的活力都有不同程度的抑制作用(表2),其中,对离体羧酸酯酶

表3 黄荆种子总生物碱溶液对棉蚜无翅成蚜离体多酚氧化酶活力的影响($\bar{X} \pm SE$)¹⁾
 Table 3 Effect of total alkaloids solution from *Vitex negundo* L. seeds on polyphenol oxidase activity *in vitro* from apterous adults of *Aphis gossypii* Glover ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

总生物碱质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration of total alkaloids	活力/U Activity
0.000 (CK)	$15.541 \pm 1.264\text{f}$
0.500	$19.864 \pm 0.864\text{e}$
1.000	$23.993 \pm 1.331\text{d}$
2.000	$32.012 \pm 1.820\text{c}$
4.000	$37.447 \pm 1.394\text{b}$
8.000	$46.352 \pm 1.121\text{a}$

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示经 Fisher's LSD 法检验差异显著($P \leq 0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference tested by Fisher's LSD method ($P \leq 0.05$).

处理棉蚜无翅成蚜,体内乙酰胆碱酯酶、多酚氧化酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶活力的变化见表4。

与对照组相比,经黄荆种子总生物碱 LD_{50} 剂量处理棉蚜无翅成蚜后 3、6、12 和 24 h,成蚜体内乙酰胆碱酯酶的比活力显著降低,分别为对照的 74.58%、73.70%、69.09% 和 61.73%,表明黄荆种子总生物碱对成蚜体内乙酰胆碱酯酶的比活力有显著的抑制作用。与对照相比,用黄荆种子总生物碱 LD_{50} 剂量处理成蚜后 3~24 h,成蚜体内羧酸酯酶的比活力和谷胱甘肽-S-转移酶的活力均受到显著抑制,且前者的比

活力降低幅度更大;处理后 3、6、12 和 24 h,羧酸酯酶比活力分别仅为对照的 66.24%、62.59%、54.71% 和 54.31%,而谷胱甘肽-S-转移酶的活力分别为对照的 83.76%、82.08%、81.76% 和 85.24%。

与对照组相比,黄荆种子总生物碱 LD_{50} 剂量处理对成蚜体内多酚氧化酶活力有显著的激活作用,处理后 3、6、12 和 24 h,多酚氧化酶活力分别为对照的 1.15、1.22、1.19 和 1.32 倍。其原因可能是由于黄荆种子总生物碱诱导了成蚜的防御反应,导致多酚氧化酶活力增加。

表4 黄荆种子总生物碱 LD_{50} 剂量(每头 $0.073 \mu\text{g}$)对棉蚜无翅成蚜体内酶活力的影响 ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 4 Effect of total alkaloids at the dose of LD_{50} ($0.073 \mu\text{g}$ per apterous adult) from *Vitex negundo* L. seeds on enzyme activity *in vivo* from apterous adults of *Aphis gossypii* Glover ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

处理组 Treatment group	取样 时间/h Sampling time	比活力/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ Specific activity		活力/U Activity	
		乙酰胆碱酯酶 Acetylcholinesterase	羧酸酯酶 Carboxylesterase	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	谷胱甘肽-S-转移酶 Glutathione-S-transferase
对照 CK	3	20.354±1.382 *	7.103±0.339 *	18.122±0.665	120.363±4.451 *
总生物碱 Total alkaloids	3	15.181±0.744	4.705±0.395	20.925±0.702 *	100.822±5.012
对照 CK	6	22.245±0.943 *	8.794±0.362 *	18.444±0.735	122.502±4.493 *
总生物碱 Total alkaloids	6	16.394±1.083	5.504±0.405	22.452±1.136 *	100.555±4.437
对照 CK	12	23.507±0.990 *	9.404±0.315 *	21.424±1.025	129.513±5.119 *
总生物碱 Total alkaloids	12	16.241±1.174	5.145±0.293	25.436±0.796 *	105.895±4.345
对照 CK	24	24.207±0.776 *	8.402±0.414 *	20.977±1.338	129.983±5.676 *
总生物碱 Total alkaloids	24	14.942±1.154	4.563±0.395	27.585±1.553 *	110.795±4.795

¹⁾ * : $P \leq 0.05$.

3 讨论和结论

生物碱是植物有毒成分中分布范围最广、组成成分最多的一类天然含氮有机化合物,已发现含生物碱的杀虫植物有 508 种,分属于 108 科,较多分布于蝶形花科(Papilionaceae)(27 属)、菊科(Compositae)(23 属)、茄科(Solanaceae)(14 属)和夹竹桃科(Apocynaceae)(11 属)的植物中^[23]。许多植物生物碱对昆虫具有毒杀、拒食、忌避、抑制生长发育、不育和引诱等多种作用方式,如百部碱、苦参碱和藜芦碱等对害虫兼具触杀和胃毒作用;哌啶生物碱对毛虫、桃蚜、斜纹夜蛾和小菜蛾等都有明显的毒杀效果^[24]。目前国内外已开发的生物碱类杀虫剂有硫酸烟碱、黑叶 40、藜芦碱和以里安那碱等^[25]。另外,植物生物碱也是人工“仿生”合成新杀虫剂的重要先导化合物的主要来源,其中,氯化烟酰类杀虫剂就是以烟碱为先导化合物成功开发并商品化的农药^[26],也是继除虫

菊酯类后的第 2 大类仿生农药^[27]。

据文献报道:烟碱对萝卜蚜无翅成蚜的 LC_{50} 为 $1\ 090.65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[28];氧化苦参碱对蚕豆蚜 2 龄若蚜和桃蚜混合种群的 LC_{50} 分别为 $3\ 811.95$ 和 $7\ 633.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,槐果碱对蚕豆蚜 2 龄若蚜和桃蚜混合种群的 LC_{50} 分别为 $3\ 300.70$ 和 $4\ 619.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[29]。本研究采用点滴法用黄荆种子总生物碱处理棉蚜无翅成蚜,对单头棉蚜无翅成蚜的 LD_{50} 为 $0.073 \mu\text{g}$,推测黄荆种子总生物碱的毒力比上述文献报道的几种生物碱更高。黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜还有一定的忌避作用和持续控制效应;以黄荆种子总生物碱 LD_{30} 剂量处理棉蚜无翅成蚜,成蚜存活时间比对照明显缩短且繁殖力降低,且对单头成蚜的排蜜频率和排蜜量以及每滴蜜滴质量均有影响。表明黄荆种子总生物碱 LD_{30} 剂量不但可显著抑制棉蚜无翅成蚜种群增长,且致毒方式多样,对害虫的可持续控制作用强,具有一定的开发和利用价值。

生物碱对昆虫的影响是多方面的,不仅可以作用

于昆虫的神经系统,还可刺激或抑制昆虫取食、影响昆虫产卵以及抑制微粒体氧化酶等^[30]。罗万春等^[28]的研究结果表明:苦豆子总碱和野靛碱对昆虫的乙酰胆碱酯酶活性有显著的抑制作用。而黄荆种子总生物碱不仅对棉蚜无翅成蚜的靶标酶——乙酰胆碱酯酶活力的抑制作用显著,还对羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的活力有较强的抑制作用。乙酰胆碱酯酶对于昆虫神经兴奋传导起关键作用,其活性被抑制势必影响甚至阻断昆虫神经冲动的传导;羧酸酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶是昆虫体内2种最重要的解毒酶系,对解毒酶系的抑制将影响昆虫对有毒外源物质的氧化、代谢和解毒,进而影响其解毒代谢并引起死亡^[31]。由此表明:黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜的毒杀作用机制较为复杂。

研究结果显示:黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜离体及体内多酚氧化酶活性有显著的激活作用。多酚氧化酶广泛存在于各种生物体内,该酶在昆虫变态发育过程中表皮的硬化和黑化、卵壳的鞣化过程以及对外源物质的免疫防御过程均有十分重要的作用^[32]。据文献报道:外源物质芹菜素对试虫的酚氧化酶产生抑制作用,可以导致试虫不能正常生长发育^[33-34];马志卿等^[35]报道:松油烯-4-醇对粘虫多酚氧化酶也有明显的抑制作用;刘伟等^[36]认为:单宁酸对甜菜夜蛾的作用靶标为酚氧化酶,对酚氧化酶活性的抑制作用可导致试虫不能完成正常的蜕皮变态过程,使试虫生长发育受限直至死亡。因而,许多化合物对害虫的毒杀作用机制是通过抑制害虫体内酚氧化酶的活性影响其生长发育过程,而黄荆种子总生物碱对棉蚜无翅成蚜多酚氧化酶活性具有激活作用,这一作用是否也会影响棉蚜无翅成蚜的发育过程?尚需进一步的研究。

参考文献:

- [1] 郭少雄,邢媛媛,王有名. 新烟碱类似物构效关系的研究进展[J]. 精细化工中间体, 2007, 37(2): 6-8, 36.
- [2] Zheng C J, Huang B K, Wang Y, et al. Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo* [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2010, 18(1): 175-181.
- [3] Tiwari O P, Tripathi Y B. Antioxidant properties of different fractions of *Vitex negundo* Linn. [J]. Food Chemistry, 2007, 100(3): 1170-1176.
- [4] Zheng C J, Tang W Z, Huang B K, et al. Bioactivity-guided fractionation for analgesic properties and constituents of *Vitex negundo* L. seeds[J]. Phytomedicine, 2009, 16(6/7): 560-567.
- [5] 卢传兵,薛明,刘雨晴,等. 黄荆挥发油对玉米象的生物活性及种群控制作用[J]. 粮食储藏, 2005, 34(6): 13-16.
- [6] 卢传兵,薛明,刘雨晴,等. 黄荆精油对玉米象的杀虫活性成分、毒力及作用机制[J]. 昆虫学报, 2009, 52(2): 159-167.
- [7] 蒋恩顺,薛明,刘雨晴,等. 黄荆提取物对蚜虫的毒力及其与吡虫啉的联合毒力[J]. 应用生态学报, 2009, 20(3): 686-690.
- [8] Masateru O, Yoichiro N, Chikako M, et al. Lignan derivatives and a norditerpene from the seeds of *Vitex negundo* [J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(12): 2073-2075.
- [9] 刘雨晴,薛明,张庆臣,等. 黄荆中 β -石竹烯对棉蚜的毒力和作用机理[J]. 昆虫学报, 2010, 53(4): 396-404.
- [10] 李飞,韩召军. 棉蚜饲养技术——笼罩法[J]. 昆虫知识, 2001, 38(3): 225-227.
- [11] 罗都强,冯俊涛,胡瓚,等. 雷公藤总生物碱分离及杀虫活性研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2001, 29(2): 61-64.
- [12] 袁林,薛明,刘雨晴,等. 黄荆提取物对小菜蛾幼虫毒力及对成虫的产卵忌避作用[J]. 应用生态学报, 2006, 17(4): 695-698.
- [13] 王开运,姜兴印,仪美芹,等. 山东省主要菜区瓜(棉)蚜(*Aphis gossypii* Glover)抗性及其机理研究[J]. 农药学报, 2000, 2(3): 19-24.
- [14] 周琼,梁广文,岑伊静. 温度和寄主植物对瓜蚜实验种群增长的影响[J]. 华南农业大学学报, 2002, 23(1): 31-34, 37.
- [15] 刘树生. 介绍一种饲养蚜虫的方法——新的叶子圆片法[J]. 昆虫知识, 1987, 24(2): 95-98.
- [16] 杨益众,陆宴辉,薛文杰,等. 转基因棉花中糖类和游离氨基酸含量的变化对棉蚜泌蜜量及蜜露主要成分的影响[J]. 昆虫学报, 2005, 48(4): 491-497.
- [17] 孟玲,王文全. 微量元素硼锌对棉蚜生长发育和排蜜的影响[J]. 棉花学报, 1996, 8(4): 208-211.
- [18] Ellman G L, Courtney K D, Andres Jr V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochemical Pharmacology, 1961, 7(2): 88-95.
- [19] Asperen K V. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method [J]. Journal of Insect Physiology, 1962, 8: 401-416.
- [20] Habig W H, Jakoby W B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases [J]. Methods in Enzymology, 1981, 77: 398-405.
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [22] 姜双林,赵国林,薛林贵. 苦豆子总生物碱的杀虫活性研究[J]. 甘肃高师学报, 1998, 3(3): 52-54.
- [23] 徐汉虹. 杀虫植物与植物性杀虫剂[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 135.
- [24] Park B S, Lee S E, Choi W S, et al. Insecticidal and acaricidal activity of piperonaline and piperoctadecalidine derived from dried fruits of *Piper longum* L. [J]. Crop Protection, 2002, 21(3):

- 249-251.
- [25] 罗万春, 慕立义, 李云寿. 植物源生物碱的杀虫作用[J]. 农药, 1997, 36(7): 11-15.
- [26] 徐尚成. 烟碱类杀虫剂的研究与开发进展[J]. 精细与专用化学品, 2001(5): 3-5.
- [27] 阎纯博, 袁庆生, 黄春明. 菊酯类杀虫剂的发展及应用[J]. 新疆农垦科技, 1983(3): 32-35.
- [28] 罗万春, 李云寿, 慕立义, 等. 苦豆子生物碱对萝卜蚜的毒力及其对几种酯酶的影响[J]. 昆虫学报, 1997, 40(4): 358-365.
- [29] 袁 静, 吕良忠, 丛 斌, 等. 苦参生物碱杀虫生物活性测定[J]. 农药, 2004, 43(6): 284-287.
- [30] 刘海峰, 全炳武, 田官荣, 等. 几种长白山有毒植物提取的生物碱杀虫活性[J]. 农药, 2007, 46(1): 55-57.
- [31] 冷欣夫, 唐振华, 王荫长. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 79.
- [32] 张文吉, 张友军, 韩熹莱. 棉铃虫不同龄期幼虫羧酸酯酶、谷胱甘肽转移酶、乙酰胆碱酯酶研究[J]. 植物保护学报, 1996, 23(2): 157-162.
- [33] 薛超彬, 罗万春, 丁 琦, 等. 5,7,4'-三羟基黄酮等生物源化合物对菜青虫幼虫生长发育的影响[J]. 植物保护学报, 2006, 33(2): 197-201.
- [34] 高兴祥, 罗万春, 谢桂英, 等. 芹菜素等3种生物源化合物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(3): 16-19.
- [35] 马志卿, 韩秀玲, 冯俊涛, 等. 松油烯-4-醇对粘虫几种代谢酶及酚氧化酶的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 437-442.
- [36] 刘 伟, 薛超彬, 张静静, 等. 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[J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(1): 32-37.

(责任编辑: 张明霞)

2012年《植物分类与资源学报》征订启事

《植物分类与资源学报》(原名:云南植物研究)创刊于1979年,是由中国科学院主管、中国科学院昆明植物研究所及中国植物学会承办的全国性自然科学学术期刊,为“中国自然科学核心期刊”、“中国生物学类科技核心期刊”。本刊刊载的论文在国内的生物、农林、医药、轻工等二次文献刊物中均有收录;CA、BA等从1980年起连续摘报;在生物科学的当代进展(CABS)、科学引文索引(SCI)的CI部分以及俄罗斯文摘杂志(PЖ)和国际农业科技情报系统(Agris)等都有摘报;乌利希国际期刊指南(UIPD)自20世纪80年代起刊载本刊相关出版信息。本刊目前已加入中国学术期刊(光盘版)、中国学术期刊网及万方数据库资源系统。

本刊主要刊登原创性研究论文、研究简报和综述(以约稿为主)。报道内容主要为:1)广义植物系统学相关学科,包括植物分类学、系统学、命名法、系统发生、植物区系和生物地理学;2)植物多样性保护及植物资源的可持续性利用,包括植物分子生物学、植物生理、植物生态学、植物化学及民族植物学;3)植物资源管理和监测。研究对象以野生植物为主,兼顾引种驯化后的野生物种;分布地以中国及喜马拉雅地区为主,兼顾其他区域。

本刊为双月刊,双月25日出版;全国各地邮局均可订阅,邮发代号64-11;2012年每期25.00元,全年150.00元。错过订阅时间的读者可直接与编辑部联系订阅,联系地址:云南省昆明市蓝黑路132号中国科学院昆明植物研究所(邮政编码650204);E-mail:bianji@mail.kib.ac.cn, linnana@mail.kib.ac.cn;电话及传真:0871-5223032;网址: <http://journal.kib.ac.cn>。

欢迎订阅和投稿!