

竹提取物对棉铃虫幼虫体内几种酶系活性的影响*

操海群¹ 岳永德² 彭镇华³ 花日茂¹ 汤 锋¹

(1. 安徽农业大学资源与环境学院 合肥 230036; 2. 国际竹藤网络中心 北京 100102;

3. 中国林业科学研究院 北京 100091)

关键词: 竹提取物; 棉铃虫; 中肠消化酶; 羧酸酯酶

中图分类号: S763.30; Q96

文献标识码: A

文章编号: 1001-7488(2006)07-0145-04

Effects of Bamboo Extracts on the Activities of Several Enzymes
in *Helicoverpa armigera* LarvaeCao Haiqun¹ Yue Yongde² Peng Zhenhua³ Hua Rimao¹ Tang Feng¹

(1. College of Resources and Environment, Anhui Agricultural University Hefei 230036; 2. International Centre for Bamboo & Rattan Beijing 100102;

3. Chinese Academy of Forestry Beijing 100091)

Abstract: Effects of the extracts from selected bamboos on the growth and the activities of the digestive enzyme and arboxylesterase of *Helicoverpa armigera* larvae were reported in this paper. The results showed that the extracts from *Pleioblastus juxianensis*, *Bambusa multiplex*, *Brachystachyum albostriatum* show strong growth disrupting effects on tested pest. The activities of the digestive enzyme in the larvae of *Helicoverpa armigera* fed with extract of *Pleioblastus juxianensis*, *Bambusa multiplex*, *Brachystachyum albostriatum* were higher than the control treatment, Thereinto, the activity of protease changed largest, that of amylase larger, and the activity of lipase changed a little. The activity of arboxylesterase in the larvae fed with extract of *Pleioblastus juxianensis*, *Bambusa multiplex*, *Brachystachyum albostriatum* was inhibited, the relative enzyme activities after 3 days of which were 0.626、0.637、0.602 folds compared to CK, respectively. The effect on the enzymes in *Helicoverpa armigera* larvae was reduced with the treatment time.

Key words: bamboo extracts; *Helicoverpa armigera*; digestive enzyme, arboxylesterase

植物源农药的研究与开发是当前农药学领域较为活跃的研究方向,一方面从植物中探寻新的活性先导化合物,通过类推合成进行新农药的开发;另一方面通过植物杀虫作用方式的研究,探寻新的杀虫作用靶标,通过生物合理设计开发新型环境友好农药(操海群等,2000)。研究植物提取物及其有效成分对昆虫体内代谢酶系活性的影响,探讨其杀虫作用机理,对于合理利用与开发新型植物源农药具有重要意义。

竹子是禾本科(Gramineae)竹亚科(Bambusoideae)多年生常绿植物。国内外近年来的研究表明,竹提取物具有杀菌、抗氧化、抗肿瘤等诸多生物活性作用(Chun *et al.*, 2000; 操海群等, 2003a; 杨校生, 1997)。笔者曾报道竹提取物对蚜虫、玉米象等农业害虫具有较好的杀虫活性(操海群等, 2002; 2003b)。本文以巨县苦竹(*Pleioblastus juxianensis*)、孝顺竹(*Bambusa multiplex*)、白纹短穗竹(*Brachystachyum albostriatum*)为供试材料,探讨了供试提取物对棉铃虫幼虫生长发育的影响,并测试了竹提取物对试虫体内几种酶系活性的影响。

1 材料与方

1.1 竹提取物的制备 供试竹种包括巨县苦竹、孝顺竹、白纹短穗竹,采自安徽省广德县,竹龄均为2年生。

将刚采集的竹叶和竹枝,用蒸馏水洗净,自然通风干燥,用电动粉碎机将其粉碎成粉末。取已粉碎好的供试竹种样品20g,用滤纸包实后置于250mL索氏抽提器中,加入丙酮浸泡过夜后抽提,水浴温度 $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,待提取器支管中流下的液体为无色时,即停止抽提。提取液减压浓缩,得膏状粗提物,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。巨县苦竹、孝顺竹、白纹短穗竹在该提取条件下的提取率分别为8.50%、6.62%和4.51%。

1.2 供试昆虫 棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)幼虫是在温度 $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $80\% \pm 5\%$,光周期L:D=14h:10h的条件下用人工饲料(沈晋良,1995)喂养的标准试虫。选取同一世代、同一龄期、大小基本一致的健康幼虫作为供试昆虫。

收稿日期:2004-08-21。

基金项目:国家“九五”攀登计划专项项目(95-专-07);安徽省高等学校青年教师科研资助计划项目(2003jql18)。

* 岳永德为通讯作者。

1.3 生物活性测定方法 采用饲喂称重法测试不同竹提取物对棉铃虫幼虫生长发育的影响。用丙酮将竹提取物配制成一定质量浓度的供试药液。取刚配制好的棉铃虫人工饲料 100 g,待其温度降至 50 ℃左右,加入 2.5 mL 供试药液,充分混匀,对照组加入等量的丙酮。在直径为 5 cm 的塑料培养皿中接入已知体重的棉铃虫幼虫(6~7 mg),每皿 1 头,用配好的含药饲料喂养,3 d 后全部换成正常饲料。每处理 3 次重复,每重复试虫 10 头。分别于饲喂后第 3、5 天逐头称量每个试虫的体重,并观察试虫生长发育状况。

1.4 消化酶活性的测定 将处理组和对照组的试虫冰浴解剖(每组 15 头左右存活幼虫),用预冷的 0.15 mol·L⁻¹ NaCl 溶液冲去体液,截取中肠及其内含物,-15 ℃ 贮存。测试前取出,稍溶后加 0.15 mol·L⁻¹ NaCl 溶液 8 mL,冰浴上匀浆,匀浆液用冷冻离心机 4 ℃ 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液作为测定用的中肠消化酶液。中肠蛋白酶比活力的测定采用福林-酚法,中肠淀粉酶比活力的测定采用二硝基水杨酸法(郑勇等,1996),中肠脂肪酶比活力的测定采用酸碱滴定法(西北农业大学,1986)。

1.5 羧酸酯酶活性的测定 将处理组和对照组的试虫(每组 10 头左右存活幼虫),用剪刀剪去头尾,在磷酸缓冲液中冲洗后,置于匀浆器中匀浆(匀浆器中先放入 8 mL 冷的缓冲液),匀浆液用冷冻离心机 4 ℃ 下 5 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液为测定用酶液。羧酸酯酶活性的测定参照黄涛等方法(相迟孝亮,1989)。

1.6 酶源蛋白质含量的测定 采用考马斯亮蓝 G-250 法(Bradford,1976)。取酶液 0.1 mL,加入考马斯亮蓝试剂 5 mL,混合后放置 2 min,立即用 751-GW 型分光光度计测定其 OD₅₉₅,标准曲线用牛血清蛋白制作。

2 结果与分析

2.1 竹提取物对棉铃虫幼虫生长发育的抑制作用 巨县苦竹、白纹短穗竹和孝顺竹处理组试虫 3 d 后的体重和对照组试虫相比,差异显著(表 1),体重减退率分别为 41.45%、51.15% 和 35.03%。白纹短穗竹处理组试虫 5 d 后的体重与对照组差异不显著,其体重减退率仅 10.42%,而巨县苦竹和孝顺竹提取物对棉铃虫幼虫生长发育的影响表现出一定的持效性,5 d 后的体重减退率分别达到 65.59% 和 50.50%。巨县苦竹组中多数试虫在 24 h 后出现虫体逐渐皱缩,变黑,有的伴有拉稀粪现象,发育明显滞后。

表 1 不同竹种提取物对棉铃虫幼虫体重的影响^①

Tab.1 Effects of extracts from various bamboo on body-mass of *Helicoverpa armigera* larvae

供试竹种 Selected bamboo	处理前 Before treatment/ mg	3 d 后 After 3 days/ mg	减退率 Inhibition rate/ %	5 d 后 After 5 days/ mg	减退率 Inhibition rate/ %
白纹短穗竹 <i>B. albostratum</i>	5.982 ± 0.564	49.809 ± 5.412 bc	41.45	276.60 ± 24.94 a	10.42
巨县苦竹 <i>P. juxianensis</i>	5.714 ± 0.697	41.590 ± 4.875 c	51.15	106.25 ± 19.94 c	65.59
孝顺竹 <i>Ba. glaucescens</i>	5.390 ± 0.572	55.275 ± 6.429 b	35.03	152.84 ± 25.21 b	50.50
CK	6.029 ± 0.631	85.077 ± 3.927 a	-	308.78 ± 27.25 a	-

① 提取物浓度为 0.50 mg 提取物每克饲料,表中数据为 3 次重复的统计结果。同列数据后标有相同字母者表示在 5% 水平差异不显著。下同。The concentration of each extract was 0.50 mg extract per feedstuff, figures were the statistic results of 3 replicates. Means in the same column followed by the same letters were not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test. The same below.

2.2 竹提取物对棉铃虫幼虫体内中肠消化酶活性的影响 供试竹提取物对棉铃虫中肠蛋白酶和淀粉酶的活性均有不同程度的激活作用(表 2),供试竹提取物处理试虫 72 h 后,试虫的中肠蛋白酶比活力分别是对照组试虫的 1.73~3.85 倍,淀粉酶为 1.11~2.74 倍,随着时间的延长,消化酶被激活的幅度减小。供试竹提取物对试虫中肠脂肪酶活性的影响不大。

在供试 3 种竹提取物中,巨县苦竹提取物对棉铃虫幼虫中肠消化酶活性的影响最大,其处理试虫 3 d 后,试虫中肠消化酶的比活力分别是对照组试虫的 1.18~3.85 倍,5 d 后为 1.12~2.78 倍;而白纹短穗竹提取物的影响相对较弱,其处理试虫 3 d 后,试虫中肠消化酶的比活力分别是对照组试虫的 0.92~1.73 倍,5 d 后为 1.02~1.04 倍。

2.3 竹提取物对棉铃虫幼虫体内羧酸酯酶活性的影响 供试竹提取物处理试虫 3 d 后,试虫羧酸酯酶的活性明显降低(表 3)。巨县苦竹、白纹短穗竹、孝顺竹等处理组试虫羧酸酯酶的比活力分别为 0.493 6、0.501 8、0.474 2 μmol·(30 min)⁻¹ mg⁻¹ pro,分别是对照组的 0.626、0.637、0.602 倍。5 d 后,各处理羧酸酯酶的比活力有所提高,其被抑制的幅度小于 3 d,分别是对照组试虫羧酸酯酶活性的 0.819、0.867、0.844 倍。

表2 竹提取物对棉铃虫幼虫中肠消化酶活性的影响^①Tab.2 Effects of extracts from bamboo on the activities of digestive enzyme in the larvae of *Helicoverpa armigera*

处理时间 Time	供试竹种 Selected bamboo	蛋白酶 Midgut protease		淀粉酶 Midgut amylase		脂肪酶 Midgut lipase	
		比活力 Specific activity	比值(CK为1) Ratio(CK is 1)	比活力 Specific activity	比值(CK为1) Ratio(CK is 1)	比活力 Specific activity	比值(CK为1) Ratio(CK is 1)
3 d	巨县苦竹 <i>P. juxianensis</i>	19.41 ± 2.36 c	3.85	37.13 ± 4.19 c	2.74	0.137 4 ± 0.032 b	1.18
	白纹短穗竹 <i>B. albostriatum</i>	8.70 ± 1.05 b	1.73	15.03 ± 2.16 a	1.11	0.107 6 ± 0.025 a	0.92
	孝顺竹 <i>Ba. glaucescens</i>	14.30 ± 1.83 c	2.84	17.46 ± 2.08 b	1.29	0.150 8 ± 0.051 b	1.29
	CK	5.04 ± 0.68 a	—	13.54 ± 1.93 a	—	0.117 0 ± 0.044 a	—
5 d	巨县苦竹 <i>P. juxianensis</i>	25.49 ± 3.21 c	2.78	33.07 ± 4.37 c	2.33	0.115 9 ± 0.058 b	1.12
	白纹短穗竹 <i>B. albostriatum</i>	9.38 ± 0.92 a	1.02	14.75 ± 1.43 a	1.04	0.105 3 ± 0.047 a	1.02
	孝顺竹 <i>Ba. glaucescens</i>	14.30 ± 1.79 b	1.56	17.38 ± 2.53 b	1.23	0.112 6 ± 0.062 a	1.09
	CK	9.17 ± 1.56 a	—	14.18 ± 2.29 a	—	0.103 5 ± 0.029 a	—

①蛋白酶比活力单位为每分钟每毫克蛋白质转化酪氨酸的微克数;淀粉酶比活力单位为每分钟每毫克蛋白质转化麦芽糖的微克数;脂肪酶比活力单位为每分钟每毫克蛋白质水解生成脂肪酸的微克分子数。The activity of protease, amylase or lipase is expressed by the quantity of tyrosine, maltose or fatty acid converted per minute per milligram protein, and its unit is $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{pro}$.

表3 竹提取物对棉铃虫幼虫羧酸酯酶活性的影响^①Tab.3 Effects of bamboo extracts on the activities of arboxylesterase in the larvae of *Helicoverpa armigera*

供试竹种 Selected bamboo	3 d		5 d	
	比活力 Specific activity	比值(CK为1) Ratio(CK is 1)	比活力 Specific activity	比值(CK为1) Ratio(CK is 1)
巨县苦竹 <i>P. juxianensis</i>	0.493 6 ± 0.042 b	0.626	0.579 8 ± 0.063 b	0.819
白纹短穗竹 <i>B. albostriatum</i>	0.501 8 ± 0.038 b	0.637	0.613 8 ± 0.082 b	0.867
孝顺竹 <i>Ba. glaucescens</i>	0.474 2 ± 0.021 b	0.602	0.597 2 ± 0.067 b	0.844
CK	0.788 2 ± 0.052 a	—	0.707 8 ± 0.096 a	—

①比活力单位为30分钟每毫克蛋白质水解底物 α -醋酸萘酯的 μmol 数。The activity of esterase is expressed by the quantity of α -naphthylacetate esterase hydrolysed per minute per milligram protein, and its unit is $\mu\text{mol}\cdot(30\text{min})^{-1}\text{mg}^{-1}\text{pro}$.

3 小结与讨论

巨县苦竹、孝顺竹等提取物对棉铃虫幼虫的生长发育具有一定的抑制作用,同时明显激活了试虫中肠消化酶的活性。对棉铃虫幼虫生长发育抑制作用大的竹提取物,其对试虫中肠消化酶活性的激活作用也强。这正是昆虫通过增加代谢酶活性来克服因外源物的加入所引起的体内正常代谢平衡失调,从而维持正常生命活动的结果。付昌斌等(2000)报道的研究结果与本文相似:用沙地柏(*Sabina vulgaris*)处理粘虫(*Mythimna separata*)72 h后,试虫中肠内蛋白酶的活性显著增高,处理组比活力比对照组高2.3倍。当然,也有一部分植物杀虫物质对昆虫中肠消化酶的活性没有影响,或表现为抑制作用。比如,苦皮藤素V处理东方粘虫(*Leucania separata*)后,试虫中肠消化酶的活性无显著变化。试验证实苦皮藤素V主要作用于昆虫中肠细胞的质膜及其内膜系统(刘惠霞等,1998)。而来源于苦楝(*Melia azedarach*)和或川楝(*Melia tooseendan*)的杀虫活性成分川楝素,对菜青虫(*Argyrogramma agnata*)中肠蛋白酶的活性具有一定程度的抑制作用,对淀粉酶和脂肪酶活性均无明显影响(张兴等,1992)。

羧酸酯酶是昆虫体内重要的解毒酶系之一,一方面具有生理功能,代谢内源化合物,同时也具有防御功能,保护自身免受外来不利因子的为害(Yu et al., 1979)。砂地柏提取物对羧酸酯酶活性表现出诱导激活作用,被认为是昆虫对外来物的一种自身防御机制(付昌斌等,2000)。而川楝素对菜青虫中肠酯酶的活性具有抑制作用(张兴等,1992),本试验用巨县苦竹等竹提取物处理棉铃虫幼虫后,其羧酸酯酶的活性显著降低。对棉铃虫幼虫生长发育抑制作用稍强的巨县苦竹、孝顺竹提取物对羧酸酯酶活性的抑制作用强于白纹短穗竹提取物。试验证明,昆虫对植物次生物质的解毒酶系与其对杀虫药剂的代谢酶系相同或相近(Ahmad et

al., 1979)。上述研究结果为竹提取物与一些特定化学农药混用提供了一定的理论基础。

在实验过程中,作者还测定了毛金竹(*Phyllostachys nigra* var. *henonis*)、灰水竹(*Phyllostachys platyglossa*)、毛竹(*Phyllostachys pubescens*)、苦竹(*Pleioblastus amarus*)、青皮竹(*Bambusa textilis*)、阔叶箬竹(*Indocalamus latifolius*)、短穗竹(*Brachystachyum densiflorum*)等提取物对棉铃虫幼虫生长发育的抑制作用,结果表明:除了巨县苦竹、孝顺竹和白纹短穗竹提取物表现较为突出外,其他竹种的提取物影响不大,3 d后体重减退率仅达10%,5 d后几乎没有差异。作者曾报道竹提取物对蚜虫具有非常突出的触杀作用以及较强的拒食作用(操海群等,2003b),而其对鳞翅目害虫的生物活性则相对较差,竹提取物对棉铃虫的拒食作用在12 h效果较为明显,24 h拒食率却平均下降了16.5%,下降幅度最大达39%。笔者认为:竹提取物在杀虫活性上表现出的局限性与其对昆虫体内代谢酶活性的影响有直接关系,有待进一步研究。

近年来人们热衷于研究的杀虫植物大多本身资源有限,特别是一些木本植物,利用其根皮、茎皮制成植物性杀虫制剂便破坏了整株植物,这也是目前杀虫植物直接开发利用的主要限制因素之一(吴文君等,1998)。由于我国是世界上最主要产竹国,有着400多竹种和360多万 hm^2 竹林,竹林面积、竹林蓄积产量均具世界首位(江泽慧,2002)。更为重要得是,本文所研究的竹提取物来源于竹叶等竹材采伐废料,不影响竹子的生长发育以及竹材的生产。因此,利用资源如此丰富的竹材废料,开发新型环境友好农药无疑具有相当广阔的前景。同时,竹提取物的直接开发利用,对于竹资源的综合利用也具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- 操海群,岳永德,花日茂,等.2000.植物源农药研究进展.安徽农业大学学报,27(1):40-44
- 操海群,岳永德,彭镇华,等.2003a.竹提取物抗真菌作用.植物保护学报,30(1):34-40
- 操海群,岳永德,彭镇华,等.2003b.竹提取物对蚜虫生物活性的研究.植物保护,29(2):33-36
- 操海群,岳永德,彭镇华,等.2002.竹提取物对玉米象生物活性的初步研究.农药学学报,4(1):80-84
- 付昌斌,张兴.2000.砂地柏提取物对粘虫幼虫体内几种酶系活性的影响.植物保护学报,27(1):75-78
- 刘惠霞,吴文君.1998.苦皮藤素V对东方粘虫中肠细胞及其消化酶活性的影响.昆虫学报,41(3):258-261
- 江泽慧主编.2002.世界竹类.沈阳:辽宁科学技术出版社
- 沈晋良.1995.棉铃虫抗性及其治理.北京:中国农业出版社
- 吴文君,刘惠霞,朱靖博,等.1998.天然产物杀虫剂——原理、方法、实践.西安:陕西科学技术出版社
- 西北农业大学.1986.基础生化试验指导.西安:陕西科技出版社,83-85
- 相迟孝亮.1989.酶应用手册.黄涛,胡系智,译.上海:上海科学技术出版社,204-207
- 杨校生.1997.国内外竹子化学利用及其研究概况.林业科技开发,2:8-10
- 张兴,赵善欢.1992.川楝素对菜青虫体内几种酶系活性的影响.昆虫学报,35(2):171-177
- 郑勇,郑德平.1996.酶在食品工业中的应用.北京:中国轻工业出版社,64-65
- Ahmad S, Brattsten L B, Mullin C A, et al. 1979. Enzymes involved in the metabolism of plant allelochemicals//Brattstern L B and Ahmad S. Molecular Aspects of Insect Plant Associations. Plenum Press, New York, London, 73-151
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72:248-254
- Chun Hu, Zhang Ying, Kitts D D. 2000. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *henonis* leaf extract in vitro. J Agric Food Chem, 48: 3170-3173
- Yu S J, Berry R E, Terriene L C. 1979. Host plant stimulation of detoxifying enzymes in a phytophagous insect. Pestic Biochem Pysiol, 12:280

(责任编辑 朱乾坤)