

几种中药提取物对二斑叶螨的生物活性及其对主要解毒代谢酶活性的影响

宋珊珊, 王 辉, 王章训, 王新谱*

(宁夏大学农学院, 银川 750021)

摘要 用3种不同有机溶剂对蛇床子 *Cnidium monnieri*、白头翁 *Pulsatilla chinensis*、百部 *Stemona japonica*、半夏 *Pinellia ternata*、紫丁香 *Syringa oblata* 进行了提取, 获得15种植物粗提取物, 并采用玻片浸渍法对二斑叶螨进行室内药效测定。结果表明, 当各粗提物浓度为5.00 mg/mL时, 蛇床子丙酮提取物A-SCZ和蛇床子氯仿提取物C-SCZ在处理24 h后, 二斑叶螨的校正死亡率为100%, 具较好的杀螨活性。室内毒力试验表明, A-SCZ、C-SCZ、百部乙醇提取物E-BB、白头翁乙醇提取物E-BTW、白头翁氯仿提取物C-BTW对二斑叶螨的 LC_{50} 分别为2.68、1.68、4.14、11.91、5.93 mg/mL。测定施药后4 h和24 h二斑叶螨体内乙酰胆碱酯酶(AchE)、羧酸酯酶(CarE)、酸性磷酸酯酶(ACP)、碱性磷酸酯酶(ALP)、谷胱甘肽S转移酶(GSTs)、多功能氧化酶(MFOs)等解毒代谢酶的活力变化情况, 结果表明, 白头翁、紫丁香、蛇床子的活性成分主要抑制二斑叶螨体内AchE、GSTs、ACP和CarE而发挥杀螨作用, 而百部粗提物主要抑制的是害螨体内GSTs和MFO。A-SCZ、C-SCZ提取率达19.83%和21.62%, 表明这两种中药提取物有较高的提取率和杀螨活性, 具有很大的开发潜力。

关键词 中药提取物; 二斑叶螨; 蛇床子; 白头翁; 百部; 半夏; 紫丁香; 生物活性; 解毒代谢酶

中图分类号: S 482.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.05.012

Efficacy of miticidal activity of the crude extracts of some Chinese medicines against *Tetranychus urticae*

Song Shanshan, Wang Hui, Wang Zhangxun, Wang Xinpu

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract The miticidal activity of 15 kinds of crude extracts from five Chinese medicines, including *Cnidium monnieri*, *Pulsatilla chinensis*, *Stemona japonica*, *Pinellia ternata* and *Syringa oblata* by three different solvents were determined against *Tetranychus urticae* by using the slide-dip method. The bioassay results showed that the corrected death rate of *T. urticae* was 100% at 24 h after treated with 5.00 mg/mL acetone-*C. monnieri* (A-SCZ) and chloroform-*C. monnieri* (C-SCZ), which showed a good miticidal activity. The virulence of acetone-*C. monnieri* (A-SCZ), chloroform-*C. monnieri* (C-SCZ), ethanol-*S. japonica* (E-BB), ethanol-*P. chinensis* (E-BTW) and chloroform-*P. chinensis* (C-BTW) crude extracts against *T. urticae* was measured. The results showed that the LC_{50} values were 2.68 mg/mL, 1.68 mg/mL, 4.14 mg/mL, 11.91 mg/mL, 5.93 mg/mL, respectively. The activities of acetylcholinesterase, carboxylic acid esterase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, glutathione S-transferase, multi-function oxidase of *T. urticae* were determined at 4 h and 24 h after application of the extracts. The results showed that the active ingredients of *P. chinensis*, *S. oblata*, and *C. monnieri* inhibited acetylcholinesterase, glutathione S-transferase, phosphatase and carboxylesterase of *T. urticae*, but *S. japonica* inhibited glutathione S-transferase and multi-function oxidase of *T. urticae*. The extraction rates of acetone-*C. monnieri* (A-SCZ) and chloroform-*C. monnieri* (C-SCZ) were 19.83% and 21.62%, respectively. Because of the high extraction rate and high acaricidal activity, these two crude extracts have great potential for development.

Key words crude extract of Chinese medicine; *Tetranychus urticae*; *Cnidium monnieri*; *Pulsatilla chinensis*; *Stemona japonica*; *Pinellia ternata*; *Syringa oblata*; miticidal activity; metabolic detoxification enzyme

化学农药在防治病虫害方面起到了重要作用,但长期以来,大量的化学农药造成农药残留日益加重,不仅破坏了作物的品质,还影响了农业生态环境,直接危害人体健康。植物源农药因其低毒、低残留的特性而受到市场的迫切需求。从天然产物,尤其是从植物中发现杀虫活性物质,是创制新型无公害农药的重要途径。我国的植物资源丰富,传统中药材在治疗和缓解人类各种疾病中起着非常重要的辅助作用,且其具有获取方式方便、经济、对环境伤害低等优点^[1]。因而从中草药中筛出杀虫活性高的活性物质,作为环境友好型农药用于防治害虫,成为植物源农药开发应用的研究热点。前人对从药用植物中提取潜在的杀虫活性物质做了大量的研究工作,豆科、菊科、茄科、唇形科和伞形科植物对害螨具有很好的触杀作用,如苦豆子 *Sophora alopecuroides* Linn.、川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc.、丁香草 *Asmonia elliptica* Roem. et Schull.、青蒿 *Artemisia annua* Linn.、烟草 *Nicotiana tabacum* Linn.、黄柏 *Phellodendron chinense* Schneid.、益母草 *Leonurus artemisia* (Lour.) S. Y. Hu、番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill.、瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* Linn.、尾叶鱼藤 *Derris caudatilimba* How 和含羞草 *Mimosa pudica* Linn. 等植物的粗提物都被证明具有较高的杀螨活性^[2-10]。已经开发出了印楝素、苦参碱、蛇床子素和烟碱·苦参碱等植物源农药产品^[11-15]。

害虫体内的各种解毒代谢酶及其他生化酶在对杀虫剂等的代谢中起重要作用,可以促进害虫对

外源有害物质和次生代谢物质的解毒代谢。如酯酶能够水解羧酸酯键和磷酸酯键,尤其是水溶性短链酯类;多功能氧化酶能够通过羟基化、氧化水解等催化各种结构不同的物质氧化^[16];谷胱甘肽转移酶在保护组织抵御氧化侵害及氧化压力中起重要作用^[17]。

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 属蜱螨目,叶螨科,是一种世界性害螨^[18]。1983 年我国北京地区首次发现二斑叶螨为害花卉作物,现已逐渐成为果树和蔬菜作物的重要害螨之一^[19]。二斑叶螨因寄主范围广、繁殖速度快、抗药性强、隐蔽性强,成为世界范围内农业生产上的一个重要问题。其寄主植物非常繁杂广泛,据记载共有 50 科 800 余种,可寄生于果树、蔬菜、花卉、田间农作物及农田杂草上^[20-22]。

本研究选取蛇床子 *Cnidium monnieri* (Linn.) Cusson、白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge.) Regel、百部 *Stemona japonica* (Blume.) Miq.、半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit、紫丁香 *Syringa oblata* Lindl. 5 种中药材,用乙醇、丙酮和氯仿 3 种有机溶剂共获得 15 种粗提物,进行室内药效试验和毒力测定,以期筛选出对二斑叶螨具有较好生物活性的中药材,为中药材的综合开发利用和研制防治二斑叶螨的植物源杀螨剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

试验所用主要试剂详见表 1。

表 1 试验主要试剂
Table 1 Main reagents

试剂名称 Reagent	纯度 Purity	生产厂家 Manufacturer
氢氧化钠	99%	天津市北联精细化学品开发有限公司
磷酸氢二钠	99%	天津市滨海科迪化学试剂有限公司
乙醇	95%	上海禾颖化工有限公司
氯仿	分析纯	青岛精科仪器试剂有限公司
丙酮	分析纯	上海津力化工有限公司
磷酸二氢钠(批号 20120308)	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
乙酰胆碱酯酶(AchE)试剂盒	—	苏州科铭生物技术有限公司
羧酸酯酶(CarE)试剂盒	—	苏州科铭生物技术有限公司
酸性磷酸酯酶(ACP)试剂盒	—	苏州科铭生物技术有限公司
碱性磷酸酯酶(ALP)试剂盒	—	苏州科铭生物技术有限公司
谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)试剂盒	—	苏州科铭生物技术有限公司
蛋白含量测定试剂盒	—	苏州科铭生物技术有限公司
多功能氧化酶(MFO)试剂盒	—	南京建成生物科技有限公司

1.2 主要仪器

试验所用主要仪器设备详见表 2。

表 2 试验主要仪器
Table 2 Main experimental instruments

仪器设备 Instrument and equipment	型号 Model	生产厂家 Manufacturer
新型高速连续式超微粉碎机	CLF-30B	浙江省新昌县城关红利数控制造厂
索式提取器	BSXT 06	上海比朗仪器制造有限公司
智能人工气候培养箱	RTOP-260D	浙江托普仪器有限公司
水浴摇床	TS-110X30	上海柏欣仪器设备厂
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9420A	上海一恒科学仪器有限公司
电子天平	LE204E/02	梅特勒-托利多上海仪器有限公司
循环水真空泵	SHZ-Ⅲ	上海亚荣生化仪器厂
旋转蒸发器	OSB-2100	EYELA 日本东京理化
旋转蒸发器	N-1100	EYELA 日本东京理化
冰箱	BCD-575WBDL	青岛海尔股份有限公司
尼康体视显微镜	SMZ745T	南京兆坤仪器有限公司
多功能荧光酶标仪	SP-Max 3500FL	上海闪谱生物科技有限公司
制冰机	YKKY FM70	北京长流科学仪器有限公司

1.3 供试叶螨

供试二斑叶螨于 2014 年 7 月采自宁夏银川市玉米田,经鉴定后在室内接种到菜豆上纯化种群,扩大繁殖备用。

1.4 供试材料

试验所用蛇床子、白头翁、百部、半夏中药材均采购自宁夏中医研究院,紫丁香采自宁夏大学校园。其中蛇床子和半夏供试部位是种子,百部和白头翁的供试部位为根部,紫丁香供试部位为枝条表皮。将供试材料于 60℃下在 DHG-9420A 电热鼓风干燥箱中进行 30 min 干燥处理,之后用 CLF-30B 超微粉碎机将植物样品粉碎分装后在低温下

保存备用。

1.5 试验方法

1.5.1 粗提物的制备

准确称取备用中药材样品 100 g,放入 2 000 mL 烧杯中,加入 1 000 mL 95%乙醇溶液,浸泡 24 h 后,超声提取 30 min,抽滤,滤渣再加 1 000 mL 95%乙醇超声提取 30 min,抽滤,合并两次滤液,用旋转蒸发器浓缩成浸膏状,将滤渣烘干用以计算提取率,将原液放入 4℃冰箱中保存备用。

丙酮和氯仿作为萃取剂的方法同上,试剂均为分析纯。

各溶剂对不同材料的粗提物缩写见表 3。

表 3 各植物粗提物与其缩写对照表

Table 3 Comparison of the crude extracts and their abbreviations

粗提物 Crude extract	缩写 Abbreviation	粗提物 Crude extract	缩写 Abbreviation
乙醇-百部粗提物	E-BB	丙酮-白头翁粗提物	A-BTW
乙醇-蛇床子粗提物	E-SCZ	丙酮-半夏粗提物	A-BX
乙醇-紫丁香粗提物	E-ZDX	氯仿-百部粗提物	C-BB
乙醇-白头翁粗提物	E-BTW	氯仿-蛇床子粗提物	C-SCZ
乙醇-半夏粗提物	E-BX	氯仿-紫丁香粗提物	C-ZDX
丙酮-百部粗提物	A-BB	氯仿-白头翁粗提物	C-BTW
丙酮-蛇床子粗提物	A-SCZ	氯仿-半夏粗提物	C-BX
丙酮-紫丁香粗提物	A-ZDX		

1.5.2 室内药效试验和毒力测定方法

室内药效试验:参照 FAO 推荐的测定螨类害虫的标准方法—玻片浸渍法(slide-dip method)。方法是

是将双面胶带剪成载玻片宽度长短(约 3 cm),贴在

载玻片的一端,揭去胶带上的纸片,用小号勾线笔在豆苗叶片上挑选大小一致,活性较强的成螨,在体视显微镜下将其背部向下贴在双面胶上,各螯肢可以自由活动,每个载玻片上粘两行,每行 20 头,于培养

箱中内放置 2 h,用解剖镜观察,严格剔除死亡、不活泼、幼螨及体位不合适的叶螨个体,保留活跃的成螨为测试虫源。试供植物粗提物的浓度为 5 mg/mL,以清水处理作对照,所有处理重复 3 次。将载玻片带虫的一端浸入药液轻轻摇晃,在药液中停留 5 s 后取出,马上在体视显微镜下用滤纸吸干螨体和周围多余的药液,将载玻片平放入装有湿润棉花的培养皿中,置于温度为 $(28\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 60%、光周期 16L//8D 的培养箱中培养。在浸药 24、48 h 后分别统计二斑叶螨的存活情况,以勾线笔轻触螨体,螯肢不动者视为死亡。记录各组死亡和存活的数量并计算校正死亡率。

用 Abbott 公式计算校正死亡率。

死亡率(%)=死亡虫数/总虫数 $\times 100$;

校正死亡率(%)=(处理死亡率-对照死亡率) $\times 100/(1-\text{对照死亡率})$;

室内毒力测定:根据室内药效试验的结果,设计室内毒力测定的浓度梯度,每处理 5 个浓度梯度,设 3 次重复,以清水为对照。统计浸药处理后 48 h 二斑叶螨死亡率,计算毒力曲线,试验方法同室内药效试验。

1.5.3 二斑叶螨解毒代谢酶比活力的测定

挑选 18 盆长势良好、鲜嫩的豆苗,每盆接种二斑叶螨约 200 头,正常饲养繁殖一周左右备用。取各中药处理中毒力效果最佳的提取物用乙醇稀释至致死中浓度后,对单盆带虫豆苗均匀喷施。以不作处理的带虫豆苗为对照,每组重复 3 次。于 4、24 h 后分别测定其体内的酶比活力。

以小号勾线笔轻取不同处理的试虫各 200 头,加入 2 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(多功能氧化酶 MFO;匀浆时取 1 mL pH=7.3 PBS 缓冲液;谷胱甘肽 S 转移酶:匀浆时取 1.5 mL pH=7.5 PBS 缓冲液;乙酰胆碱酯酶:匀浆时取 1.5 mL pH=7.0 PBS 缓冲液;羧酸酯酶:取 1.5 mL pH=7.0 PBS 缓冲液;磷酸酯酶:取 1.5 mL pH=7.0 PBS 缓冲液)冰浴匀浆 120 s,匀浆液在 10 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min。取上清液在 10 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下再离心 20 min,所获得的上清液用于酶活性测定。封存于-18 $^{\circ}\text{C}$ 环境下保存备用,避免反复冻融。

施药后 4 h 和 24 h 后,测定二斑叶螨体内总蛋白含量、乙酰胆碱酯酶(AchE)、羧酸酯酶(CarE)、酸性磷酸酯酶(ACP)、碱性磷酸酯酶(ALP)、谷胱甘肽

S 转移酶(GSTs)、多功能氧化酶(MFO)等解毒代谢酶的活力变化情况,具体原理为:

AchE 催化 Ach 水解生成胆碱,胆碱与二硫对硝基苯甲酸(DTNB)作用生成 5-巯基-硝基苯甲酸(TNB),TNB 在 412 nm 处有吸收峰,通过测定 412 nm 吸光度增加速率,计算 AchE 活性。

CarE:能催化乙酸-1-萘酯生成萘酯,固蓝显色;在 450 nm 光吸收增加速率,计算 CarE 活性。

磷酸酯酶:酸性(碱性)条件下,酸性(碱性)磷酸酯酶可以水解反应底物对硝基苯基磷酸二钠,产生对硝基苯酚,为黄色物质。当底物充分时,该酶活性越强,所生成的对硝基苯酚也相应越多,据此可应用比色法测定该酶比活力。

GST 催化 GSH 与 CDNB 结合,结合产物的吸收峰波长为 340 nm,通过测定 340 nm 波长处吸光度上升速率即可计算出 GST 活性。

MFO:生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定样品中昆虫多功能氧化酶(MFO)的水平。向预先包被了昆虫 MFO 单克隆抗体的酶标孔中加入 MFO,温育;温育后,加入生物素标记的抗 MFO 抗体,再与链霉亲和素-HRP 结合,形成免疫复合物,再经过温育和洗涤,去除未结合的酶,然后加入底物 A、B,产生蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅与样品中昆虫多功能氧化酶(MFO)的浓度呈正相关。

蛋白质测定方法采用考马斯亮蓝法。

根据预试验结果,选择致死率在 20%~80%之间所对应的浓度设置 5 个浓度梯度,考虑试验具体操作的方便性,将试验设计所得的浓度梯度与提取率相结合,计算转换为体积分数梯度,再将所得体积分数梯度近似取整后进行试验。

1.6 数据分析方法

用 SPSS 20.0 软件求出毒力回归方程、 LC_{50} 值、相关系数 r 及 95%置信区间,用 LSD 法进行单因素方差分析。

2 试验结果

2.1 3 种溶剂对 5 种中药的提取率

由于各有机溶剂的极性各不相同,根据相似相溶原理,不同溶剂提取出的有效成分各不相同。各中药粗提物的提取率如表 4 所示,C-SCZ 提取率最高,达 21.62%,其次为 A-SCZ,提取率达 19.83%。A-ZDX、

A-BB、C-BX、E-ZDX 等的提取率均大于 10.00%，C-ZDX、E-BB 的提取率低，仅为 4.93%和 4.92%。

表 4 不同溶剂对各中药粗提物的提取率
Table 4 Extraction rate of crude extracts from different plants by three solvents

供试植物 Plant	提取率/% Extraction rate		
	乙醇(E) Ethanol	丙酮(A) Acetone	氯仿(C) Chloroform
百部(BB) <i>Stemona japonica</i>	4.92	13.18	8.20
蛇床子(SCZ) <i>Cnidium monnieri</i>	9.23	19.83	21.62
紫丁香(ZDX) <i>Syringa oblata</i>	10.18	16.64	4.93
白头翁(BTW) <i>Pulsatilla chinensis</i>	7.80	5.89	6.24
半夏(BX) <i>Pinellia ternata</i>	9.33	5.50	11.13

表 5 5 种植物的不同溶剂粗提物校正死亡率¹⁾

Table 5 Corrected mortalities caused by the crude extracts from 5 kinds of plants with different solvents

粗提物种类 Solvent extract	24 h		48 h	
	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality
乙醇-百部(E-BB) Ethanol- <i>S. japonica</i>	(53.95±1.15)b	(53.38±1.17)b	(66.17±1.11)b	(60.75±1.16)b
乙醇-蛇床子(E-SCZ) Ethanol- <i>C. monnieri</i>	(36.13±6.97)c	(35.48±7.10)c	(44.07±11.52)de	(37.16±12.07)de
乙醇-紫丁香(E-ZDX) Ethanol- <i>S. oblata</i>	(28.25±13.12)cd	(27.52±13.38)cd	(32.14±7.10)ef	(23.75±7.43)ef
乙醇-白头翁(E-BTW) Ethanol- <i>P. chinensis</i>	(51.96±6.26)b	(51.48±6.39)b	(64.65±10.84)bc	(60.29±11.35)bc
乙醇-半夏(E-BX) Ethanol- <i>P. ternata</i>	(35.91±12.44)c	(34.47±12.68)c	(46.11±22.29)de	(38.84±23.34)de
丙酮-百部(A-BB) Acetone- <i>S. japonica</i>	(15.00±0.13)e	(11.46±0.13)e	(22.00±5.64)gf	(15.22±5.91)gf
丙酮-蛇床子(A-SCZ) Acetone- <i>C. monnieri</i>	(100.00±0.00)a	(100.00±0.00)a	(100.00±0.00)a	(100.00±0.00)a
丙酮-紫丁香(A-ZDX) Acetone- <i>S. oblata</i>	(20.39±2.27)de	(17.07±2.32)de	(28.98±7.90)gf	(22.80±8.27)gf
丙酮-白头翁(A-BTW) Acetone- <i>P. chinensis</i>	(19.00±3.44)de	(15.63±3.51)de	(24.00±2.57)gf	(17.39±2.69)gf
丙酮-半夏(A-BX) Acetone- <i>P. ternata</i>	(32.07±2.69)c	(29.31±2.74)c	(50.88±6.28)cd	(44.58±6.57)cd
氯仿-百部(C-BB) Chloroform- <i>S. japonica</i>	(35.15±6.95)c	(33.83±7.08)c	(43.76±7.72)de	(34.61±8.08)de
氯仿-蛇床子(C-SCZ) Chloroform- <i>C. monnieri</i>	(100.00±0.00)a	(100.00±0.00)a	(100.00±0.00)a	(100.00±0.00)a
氯仿-紫丁香(C-ZDX) Chloroform- <i>S. oblata</i>	(37.22±6.74)c	(35.94±6.87)c	(43.83±5.56)de	(34.69±5.82)de
氯仿-白头翁(C-BTW) Chloroform- <i>P. chinensis</i>	(38.00±3.37)c	(36.73±3.43)c	(51.00±5.92)d	(47.02±6.20)d
氯仿-半夏(C-BX) Chloroform- <i>P. ternata</i>	(11.47±2.54)e	(10.63±2.59)e	(17.14±3.00)g	(14.67±3.15)g

1) 表中数据为 3 次重复的平均值。同列不同小写字母表示各处理间死亡率有显著性差异($P<0.05$)。
Data are the means of 3 replicates. Different lowercase letters in the same column indicate that there were significant differences in mortality among the treatments ($P<0.05$).

2.3 5 种植物粗提物对二斑叶螨成虫的室内毒力测定

选取杀虫活性较高的蛇床子丙酮提取物 A-SCZ、蛇床子氯仿提取物 C-SCZ、百部乙醇提取物 E-BB、白头翁乙醇提取物 E-BTW、白头翁氯仿提取物 C-BTW，配成浓度梯度分别为 A-SCZ：3.96、2.97、1.98、0.99、0.50 mg/mL；C-SCZ：5.40、2.70、1.35、0.68、0.34 mg/mL；E-BB：7.35、6.13、4.90、2.45、0.98 mg/mL；E-BTW：19.50、15.60、11.70、7.80、3.90 mg/mL；C-BTW：10.85、9.30、7.75、4.65、1.55 mg/mL；各 5 个浓度梯度，对二斑叶螨成虫进行毒力测定。结果如表 6 所示，5 种植物粗提物对二斑叶螨成虫均表现出较好的触杀效果，LC₅₀ 分别为

2.2 不同植物粗提物对二斑叶螨的室内药效试验

当各粗提物浓度为 5.00 mg/mL 时，24 h 和 48 h 的死亡率如表 5 所示，丙酮-蛇床子(A-SCZ)和氯仿-蛇床子(C-SCZ)均具有较高的杀螨活性，校正死亡率达 100%，乙醇-白头翁(E-BTW)杀螨活性次之，24 h 校正死亡率为 51.48%，48 h 校正死亡率为 60.29%，乙醇-百部(E-BB)的 24 h 校正死亡率为 53.38%，48 h 校正死亡率为 60.75%，也表现出较好的杀螨活性；其余植物粗提物对成螨的触杀效果均不太高，半夏的氯仿提取物(C-BX)杀螨活性最低，24 h 校正死亡率仅为 10.63%，48 h 校正死亡率为 14.67%。

2.68、1.68、4.14、11.91、5.93 mg/mL，LC₅₀ 最小的 C-SCZ 的毒力为 LC₅₀ 最高的 E-BTW 毒力的 7.27 倍，试验表明，蛇床子的氯仿粗提物和丙酮粗提物对成螨的触杀效果最好。

2.4 二斑叶螨解毒代谢酶活性变化

选取杀虫活性较高的 A-SCZ、C-SCZ、E-BB、E-BTW、C-BTW 5 种植物粗提物，测定其对二斑叶螨体内主要的解毒代谢酶活性的影响，施药 4 h 和 24 h 后二斑叶螨体内酶活如表 7 所示。

处理 4 h 后各处理组蛋白浓度均高于正常水平，且有显著性差异($P<0.05$)。各处理组 AchE 均受到显著的抑制($P<0.05$)，4 个处理间被抑制的程度无差异；GST 在各处理组中也受到显著的抑制(P

<0.05),其中蛇床子和百部处理组受到的抑制最强,显著不同于紫丁香处理组($P<0.05$);ACP、ALP、CarE在各处理中均受到了显著的抑制($P<0.05$),处理间无明显差异。白头翁、紫丁香、蛇床子处理组 MFO 的活性在用药后均有显著的提升($P<0.05$),百部处理组的 MFO 受到抑制。

表 6 5 种中药粗提物对二斑叶螨成虫的室内毒力测定

Table 6 Indoor toxicity determination of 5 kinds of crude extracts against <i>Tetranychus urticae</i>						
粗提液 Solvent extract	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	LC ₅₀ /mg·mL ⁻¹ Median lethal concentration	LC ₅₀ 置信区间/ mg·mL ⁻¹ Confidence interval	相对毒力倍数 Relative virulence factor	
C-SCZ Chloroform- <i>C. mommieri</i>	$y=4.77x+1.00$	0.93	1.68	1.08~2.66	1.00	
A-SCZ Acetone- <i>C. mommieri</i>	$y=4.61x+0.91$	0.90	2.68	1.53~4.69	1.59	
E-BB Ethanol- <i>S. japonica</i>	$y=4.03x+1.57$	0.98	4.14	3.13~5.48	2.46	
E-BTW Ethanol- <i>P. chinensis</i>	$y=2.63x+2.20$	0.97	11.91	9.78~14.51	7.27	
C-BTW Chloroform- <i>P. chinensis</i>	$y=3.54x+1.89$	0.93	5.93	4.71~7.46	3.52	

表 7 各植物粗提物处理 4 h 后二斑叶螨体内酶活¹⁾

Table 7 The enzyme activities of <i>Tetranychus urticae</i> after treatment with different crude extracts for 4 hours							
粗提物 Crude extract	蛋白/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Protein	AchE/nmol· (min·mg) ⁻¹	GST/nmol· (min·mg) ⁻¹	ACP/nmol· (min·mg) ⁻¹	ALP/nmol· (min·mg) ⁻¹	CarE/nmol· (min·mg) ⁻¹	MFO/nmol· (min·mg) ⁻¹
E-BTW Ethanol- <i>P. chinensis</i>	(155.66±13.27)ab	(6.11±3.21)b	(68.59±9.26)bc	(0.23±0.00)b	(3.59±0.78)b	(5.67±1.09)b	(31.20±0.62)c
C-ZDX Chloroform- <i>S. oblata</i>	(162.90±1.12)a	(7.00±2.50)b	(146.45±8.64)b	(0.30±0.01)b	(5.13±1.58)b	(6.51±0.81)b	(42.50±0.62)a
C-SCZ Chloroform- <i>C. mommieri</i>	(145.38±2.04)b	(10.07±3.57)b	(29.01±5.22)c	(0.48±0.01)b	(5.23±1.12)b	(5.60±0.43)b	(37.98±0.41)b
E-BB Ethanol- <i>S. japonica</i>	(166.97±3.04)a	(1.96±0.69)b	(70.28±1.95)bc	(1.69±0.04)b	(7.39±0.17)b	(12.73±1.37)b	(1.15±0.05)e
未处理 CK	(17.99±1.58)c	(54.09±8.10)a	(716.98±30.17)a	(13.39±1.84)a	(58.75±5.79)a	(74.57±14.37)a	(2.98±0.02)d

1) 同列不同小写字母表示各处理间酶活含量有显著性差异($P<0.05$)。
Different lowercase letters in the same column indicate that there were significant differences in enzyme activity among the treatments ($P<0.05$).

处理 24 h 后白头翁、紫丁香、蛇床子处理组蛋白浓度显著高于正常水平($P<0.05$),百部处理组蛋白浓度与正常水平无差异。白头翁、紫丁香、蛇床子处理组 AchE 均受到显著的抑制($P<0.05$),百部处理组活性与正常水平无明显差异;GST 在各处理组中也受到显著的抑制,其中白头翁处理组受到的抑制最强,显著不同于其他 3 个处理组($P<0.05$);

白头翁、紫丁香、蛇床子处理组的 ACP、ALP、CarE 均受到了显著的抑制($P<0.05$),且处理间无明显差异,百部处理组的 ACP、ALP、CarE 活性均显著高于正常水平($P<0.05$)。白头翁、紫丁香、蛇床子、百部处理组 MFO 的活性在用药后均有显著的提升,且各处理间有明显的差异($P<0.05$)。

表 8 各植物粗提物处理 24 h 后二斑叶螨体内酶活变化情况¹⁾

Table 8 The enzyme activities of <i>Tetranychus urticae</i> after treatment with different crude extracts for 24 hours							
粗提物 Crude extract	蛋白/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Protein	AchE/nmol· (min·mg) ⁻¹	GST/nmol· (min·mg) ⁻¹	ACP/nmol· (min·mg) ⁻¹	ALP/nmol· (min·mg) ⁻¹	CarE/nmol· (min·mg) ⁻¹	MFO/nmol· (min·mg) ⁻¹
E-BTW Ethanol- <i>P. chinensis</i>	(200.54±6.31)a	(2.17±0.67)b	(65.32±5.31)d	(0.45±0.05)c	(5.67±1.12)c	(6.45±0.91)c	(72.14±3.21)a
C-ZDX Chloroform- <i>S. oblata</i>	(108.84±9.54)b	(11.55±1.25)b	(288.16±16.34)b	(2.25±0.63)c	(6.69±0.83)c	(4.15±0.63)c	(19.63±1.67)c
C-SCZ Chloroform- <i>C. mommieri</i>	(121.36±11.83)b	(12.23±0.93)b	(177.15±12.34)c	(1.23±0.05)c	(7.79±2.03)c	(3.26±0.79)c	(43.75±2.21)b
E-BB Ethanol- <i>S. japonica</i>	(8.15±1.14)c	(60.60±9.85)a	(335.68±35.23)b	(33.14±2.23)a	(90.67±5.21)a	(226.85±13.64)a	(8.10±0.79)d
未处理 CK	(21.17±3.85)c	(58.89±5.10)a	(700.13±25.16)a	(15.62±1.66)b	(61.33±4.73)b	(85.62±16.52)b	(4.45±0.24)e

1) 同列不同小写字母表示各处理间酶活含量有显著性差异($P<0.05$)。
Different lowercase letters in the same column indicate that there were significant differences in enzyme activity among the treatments ($P<0.05$).

3 结论与讨论

本试验研究了 15 种中药粗提物对二斑叶螨成虫的毒杀活性, 结果表明 48 h 校正死亡率大于 60% 的有 4 种, 其中两种为蛇床子丙酮和氯仿提取物。蛇床子属于伞形科 Umbelliferae 蛇床属 *Cnidium* 植物, 为中华人民共和国药典规定的道地药材, 具有很高的药用价值。已有部分学者对蛇床子的杀虫活性进行了初步的研究, 马丽娜等在研究伞形科中草药乙醇提取物的杀螨活性中指出蛇床子的乙醇粗提物对柑橘全爪螨 *Panonychus citri* 的 24 h 校正死亡率为 52.12%, 杀螨活性较弱^[23], 这与本试验结果类似。李雪娇研究了蛇床子丙酮提取物对黏虫 *Mythimna separata* 的毒杀活性, 其 72 h 死亡率为 63.3%。姚英娟等研究了蛇床子无水乙醇、丙酮、乙酸乙酯、石油醚 4 种溶剂提取物对玉米象 *Sitophilus zeamais*、谷蠹和锯谷盗 *Oryzaephilus surinamensis* 成虫的驱避和触杀作用, 结果表明除石油醚提取物对锯谷盗 96 h 的校正死亡率为 20% 以外, 其余粗提物对 3 种试虫的触杀效果均较高^[24]。从已有结果来看, 蛇床子乙醇提取物对鞘翅目昆虫具有较高的触杀活性, 而对蜚蠊目等刺吸式害虫触杀效果不明显, 而丙酮提取物相对广谱, 对各种害虫都具有较高的毒杀活性。

蛇床子的主要药理活性成分是香豆素类化合物和挥发油, 以及单萜多醇、糖类和倍半萜类成分等^[25], 姚英娟推测其主要的触杀活性物质为香豆素类的蛇床子素^[24], 本试验用极性不同的溶剂获得的粗提物在较低浓度范围内均有较高杀虫活性, 根据物质极性相似相溶原理, 推测蛇床子杀螨活性成分可能有多种。具体活性物质的确定需通过进一步的试验探索。

本研究发现虽然紫丁香乙醇提取物处理的成螨校正死亡率不高, 但供试成螨均表现呆滞, 活跃度低, 故推测紫丁香乙醇提取物对二斑叶螨具有迟效性, 致死时间要长于其他药剂, 需在后续的田间药效试验中进一步验证。另外通过观察发现, 百部乙醇提取物可使成螨虫体壁普遍变薄, 一触即破, 其作用机理需进行进一步研究。

王兰英等研究表明百部丙酮粗提物对螺旋粉虱 *Aleurodicus disperses* 有较高的触杀作用 (LC₅₀ 为 4.046 7 mg/mL)^[26]。但在本试验中, 百部丙酮粗

提物对二斑叶螨作用的 LC₅₀ 高达 36.920 4 mg/mL, 与其研究结果有较大出入, 分析原因可能有以下几方面: 供试虫源的种类不同, 对提取物反应也不同, 在化学农药中, 杀螨剂和杀虫剂常表现出很大不同; 提取方法不同也能导致活性有较大差异。

酶活变化结果表明, 白头翁、紫丁香、蛇床子的活性成分主要抑制二斑叶螨体内乙酰胆碱酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶、磷酸酯酶和羧酸酯酶而发挥杀螨作用, 而百部粗提物主要抑制的是害螨体内谷胱甘肽 S-转移酶和多功能氧化酶。操海群等 2006 年用巨县苦竹等竹提取物处理棉铃虫幼虫后, 幼虫体内羧酸酯酶等解毒酶系的活性显著降低^[27], 陈青等研究锡兰肉桂丙酮粗提物对皮氏叶螨体内解毒代谢酶的关系^[28], 与本文结果类似。但陈青等对大叶丁香丙酮提取物对皮氏叶螨代谢酶活性进行研究^[29], 得出丁香丙酮提取物能激活害虫体内酸性磷酸酯酶的活性, 与本文紫丁香抑制二斑叶螨体内酸性磷酸酯酶的结果有出入, 其原因可能是皮氏叶螨和二斑叶螨存在种间差异。根据酶活性的变化可以有助于分析中药杀螨活性物质的成分及其药效机理, 从而对杀螨物质的提取提供有益帮助。

参考文献

- [1] 王桂清, 姬兰柱. 中国植物源杀虫剂研究进展[J]. 中国农业科学, 2006, 39(3): 510-517.
- [2] 张兴, 马志卿, 冯俊涛, 等. 植物源农药研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 685-698.
- [3] Kwon J H, Ahn Y J. Acaricidal activity of *Cnidium officinale* rhizome-derived butylenephthalide against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae)[J]. Pest Management Science, 2003, 59 (1): 119-123.
- [4] 侯辉, 赵莉茵, 师光禄, 等. 地肤提取物杀螨活性的研究[J]. 植物保护, 2000, 30(3): 42-45.
- [5] Kim E, Kim H. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(4): 885-889.
- [6] Chatzivasiladias E A, Sabelis M W. Toxicity of methyl ketones from tomato trichomes to *Tetranychus urticae* Koch[J]. Experimental and Applied Acarology, 1997, 21(6): 473-484.
- [7] Borges L, Ferri P. *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus* [J]. Medical and Veterinary Entomology, 2003, 17(6): 228.
- [8] Chiasson H, Belanger A. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils

- obtained by different methods of extraction [J]. Journal of Economic Entomology, 2001(94): 167-171.
- [9] Kalaisekar A, Naidu V. Efficacy of some pesticides against citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora* [J]. Indian Journal of Entomology, 2003, 65(3): 308-310.
- [10] Lee H. Acaricidal activity of constituents identified in *Foeniculum vulgare* fruit oil against *Dermatophagoides* spp. (Acari: Pyroglyphidae)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(10): 2887-2889.
- [11] 杜桂林, 马崇勇, 洪军, 等. 草原沙葱萤叶甲发生趋势及植物源农药田间防治效果[J]. 植物保护, 2016, 42(4): 253-256.
- [12] 杨勇, 王建华, 吉沐祥, 等. 植物源农药丁香酚与苦参碱及其混配对葡萄灰霉病的毒力测定及田间防效[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 160-163.
- [13] 吴莹, 李希. 植物源农药蓖麻碱微乳剂技术指标的建立[J]. 中药与临床, 2016, 7(4): 29-32.
- [14] 单雪华, 郭维, 周孚美, 等. 不同植物源农药对烟青虫和斜纹夜蛾防治效果研究[J]. 作物研究, 2016, 30(4): 434-437.
- [15] 孙光忠, 刘元明, 邓劲松, 等. 植物源农药蛇床子素防治小麦白粉病田间试验[J]. 湖北植保, 2016(3): 6-7.
- [16] 申继忠, 钱传范. 昆虫多功能氧化酶及其在杀虫剂抗性中的作用[J]. 农药科学与管理, 1993(1): 12-15.
- [17] 吕敏, 刘惠霞, 吴文君. 谷胱甘肽 S 转移酶与昆虫抗药性的关系[J]. 昆虫知识, 2003, 40(3): 204-207.
- [18] 忻介六. 农业害螨学[M]. 北京: 农业出版社, 1988.
- [19] 李隆术. 农业螨类研究进展[J]. 中国农业科学, 1990, 23(1): 22-30.
- [20] 胡展育, 鄧军锐. 二斑叶螨研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2004, 23(5): 442-447.
- [21] Ho C C, Lo K K, Chen W H. Spider mite (Acari: Tetranychidae) on various crops in Taiwan [J]. Journal of Agricultural Research of China, 1997, 46(4): 333-346.
- [22] 牛永浩. 二斑叶螨生物学特性及防治技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [23] 马丽娜, 胡军华, 冉春, 等. 十种伞形科中草药乙醇提取物的杀螨活性评价[J]. 中国生物防治学报, 2009(1): 40-44.
- [24] 姚英娟, 薛东, 杨长举. 蛇床子提取物对几种储粮害虫的驱避和触杀效应[J]. 昆虫知识, 2006, 43(5): 653-655.
- [25] 周则卫, 刘培勋. 蛇床子化学成分及抗肿瘤活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(17): 1309-1313.
- [26] 王兰英, 骆焱平, 卢远倩, 等. 57 种南药植物粗提物对螺旋粉虱杀虫活性初步研究[J]. 植物保护, 2012, 38(1): 108-111.
- [27] 操海群, 岳永德, 彭镇华, 等. 竹提取物对棉铃虫幼虫体内几种酶系活性的影响[J]. 林业科学, 2006, 42(7): 145-148.
- [28] 陈青, 杨卫帆, 覃丽金, 等. 锡兰肉桂丙酮粗提物对皮氏叶螨的毒力及其代谢酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(4): 29-31.
- [29] 陈青, 杨卫帆, 覃丽金, 等. 大叶丁香丙酮提取物对皮氏叶螨的毒力及代谢酶活性的影响[J]. 热带作物学报, 2004, 25(2): 33-36.

(责任编辑: 田 喆)

征订启事

欢迎订阅 2018 年《植物保护》杂志

《植物保护》创刊于 1963 年,是由中国科协主管,中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办的学术类刊物。本刊为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊、中国农业核心期刊,已被中国科学引文数据库(CSCD)、清华同方、万方、维普、龙源期刊网、超星等各大数据库收录。曾荣获国家期刊奖提名奖(科技类)、全国优秀科技期刊奖、中国科协优秀学术期刊奖等十余项奖励。2015 年受到中国科协精品期刊工程项目资助。

报道内容:有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护各学科原创研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。理论与实践并重,对生产有很强的指导作用。

栏目设置:专论与综述、专家视角、研究报告、研究简报、调查研究、实验方法与技术、技术与应用、有害生物动态等。本刊兼营广告。

读者对象:农林业科研院所研究人员、高等院校相关专业教师及研究生、各级植保科技人员、农药研究与生产人员、植物医生、农技干部等。

发行和订阅:双月刊,大 16 开,铜版纸印刷,200 页,35 元/期,210 元/年。国内邮发代号 2-483,全国各地邮局均可订阅。国外由中国国际图书贸易总公司发行,发行代号 BM450。直接在本刊编辑部订阅,可享受 9 折优惠,全年 189 元,若需挂号,每期另加 3 元。

联系方式:北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部,邮编 100193;电话:010-62819059(兼传真);E-mail:zwbh1963@263.net;网址:http://www.plantprotection.ac.cn