

没食子酸对棉铃虫生长发育的影响及作用机理

吴思雨^{1,2#}, 梁赫^{3#}, 刘秀², 路伟³, 邵雪花^{1*}

(1. 广东省农业科学院果树研究所, 农业农村部南亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广东省热带亚热带果树研究重点实验室, 广州 510640; 2. 湖南人文科技学院, 农作物有害生物绿色防控湖南省高校重点实验室, 娄底 417000; 3. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要 为明确没食子酸(GA)对棉铃虫生长发育的影响和作用机理,用叶碟法对比了没食子酸等 21 个酚类化合物对棉铃虫幼虫的拒食活性,并从中选择了没食子酸等 3 种化合物测定了其拒食中浓度(AFC₅₀),随后采用饲料混毒法检测了没食子酸对棉铃虫生长发育的影响,进一步测定了 2 龄幼虫中肠病理变化和生长发育相关基因的表达变化。结果表明:所测 21 种酚类化合物中,没食子酸对 1 龄末幼虫的拒食活性最显著,拒食中浓度为 50.21 mg/L。以含 10 μg/g 没食子酸的饲料饲喂棉铃虫幼虫后发现其显著抑制幼虫体重、化蛹率、羽化率和卵孵化率。苏木精—伊红染色法检测到没食子酸可诱导中肠细胞大量凋亡、杯状细胞和消化细胞膨大并呈现空泡化、围食膜消失等病理变化;qPCR 分析发现没食子酸可诱导 *InR*、*p53*、*Atg8* 和 *G6Pase* 基因显著上调表达。综上,没食子酸可显著抑制棉铃虫的生长发育,同时损伤中肠,导致营养代谢紊乱,具备开发成为新型植物源杀虫剂的潜力。

关键词 没食子酸; 棉铃虫; 生长发育; 营养调控; 中肠细胞凋亡

中图分类号: S 433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2022466

Effect and mechanism of gallic acid on growth and development of *Helicoverpa armigera*

WU Siyu^{1,2#}, LIANG He^{3#}, LIU Xiu², LU Wei³, SHAO Xuehua^{1*}

(1. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Province Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research, Guangzhou 510640, China; 2. Hunan University of Humanities and Technology, Key Laboratory of Green Prevention and Control of Crop Pest in Hunan Higher Education, Loudi 417000, China; 3. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract In order to clarify the effect and mechanism of gallic acid (GA) on the growth and development of *Helicoverpa armigera*, the antifeedant activity of 21 phenolic compounds including GA on *H. armigera* larvae and the antifeedant medium concentration(AFC₅₀) of three compounds including GA were compared by leaf disc method. Then, the effect of GA on the growth and development of *H. armigera* was detected by mixing feed-compound, and the pathological changes in the midgut and the expression changes of growth and development-related genes of the 2nd-instar larvae were further analyzed. The results showed that among the 21 phenolic compounds tested, GA had the significantly antifeedant activity against the 1st-instar larvae, and AFC₅₀ was 50.21 mg/L; after feeding the larvae of *H. armigera* with the feed containing 10 μg/g GA, the larval weight, pupation rate and eclosion, and egg hatching rate were significantly inhibited. The results of hematoxylin-eosin staining revealed that GA could induce massive apoptosis of midgut cells, vacuolization of digestive cells, disappearance of peritrophic membrane. The qPCR analysis found that GA could induce significant upregulation of *InR*, *p53*, *Atg8* and *G6Pase* genes. In conclusion, GA can significantly inhibit the growth and development of *H. armigera*, and damage the midgut, lead to nutritional

收稿日期: 2022-08-02 修订日期: 2022-08-29

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发专项(2022B02033-1); 新疆农业科学院科技创新重点培育专项(xjkcpy-2020004)

* 通信作者 E-mail: sxh19831017@163.com

为并列第一作者

metabolism disorder, and has the potential to be developed into a new type of plant-derived insecticide.

Key words gallic acid; *Helicoverpa armigera*; growth and development; nutritional regulation; midgut cell apoptosis

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 是一种世界性迁飞性害虫, 广泛分布于我国黄河流域和长江流域棉区^[1]。该虫能取食 30 多科 200 余种作物, 包括棉花、玉米、小麦及多种蔬菜等。棉铃虫是棉花蕾铃期重要的钻蛀性害虫, 它通过取食棉花主茎、花蕾、花和花铃给棉花生产造成了巨大的经济损失^[2]。据不完全统计, 2018 年棉铃虫对我国棉花生产造成的经济损失高达数 10 亿元^[3], 2019 年仅新疆地区棉铃虫发生面积就高达 8 072.79 hm²^[4], 为害极其严重。目前主要通过化学防治为主, 生物防治为辅的方式对棉铃虫进行防控, 但长期使用化学杀虫剂不仅导致棉铃虫对多种有效成分产生了较高的抗性^[5], 还对环境安全造成了较大威胁。相较之下, 生物农药具有环境友好、对非靶标生物安全、不易产生抗药性等特点, 具备很大的开发利用潜力。印楝素是目前应用最成功的生物农药之一, 同时也是对鳞翅目、鞘翅目等害虫杀虫、拒食活性最高的一类化合物, 但其只能从印楝树的果实中分离获得, 成本高昂导致田间使用受限^[6]。种植 Bt 棉也是防控棉铃虫的主要生物防治方法之一, 但长期、广泛地种植 Bt 棉花将导致棉铃虫对 Bt 蛋白产生抗性^[7], 对棉铃虫防效降低, 同时还可导致其他害虫增加^[8]。因此, 寻找新的具有杀虫活性的天然产物对开发新型植物源农药具有十分重要的现实意义。

没食子酸(gallic acid, GA)是一种多酚类有机化合物, 在自然界中广泛分布, 是橄榄 *Canarium subulatum*、大叶桉 *Eucalyptus robusta*、红景天 *Rhodiola rosea*、芒果 *Mangifera indica* 等多种植物中的主要活性成分之一^[9], 具有抗炎、抗突变、抗氧化、抗病毒等多种生物活性^[10-13], 此外, 没食子酸对常见食源性致病菌和腐败菌有显著的抑菌作用, 其浓度为 0.125 mg/mL 对于单核细胞增生李斯特氏菌 *Listeria monocytogenes* 的抑制效果最为明显, 其抑菌直径(24.03±0.17)mm^[14]。研究表明, 没食子酸浓度为 30 mg/mL 时能显著抑制水稻细菌性条斑病的发生^[15]。He 等^[16]使用 40 μg/mL 的没食子酸处理人卵巢细胞 A2780/CP70 和 OVCAR-3, 发现其对细胞增殖抑制率高达 60.90%和 97.89%, 而对正常卵巢细胞无毒性。当没食子酸浓度为 100 μg/mL

时, 其对胃癌细胞 HGC-27 的增殖抑制率为 79.90%, 在一定的浓度范围内, 其浓度与抑制率呈正相关^[17]。由此可见, 作为植物中的主要活性成分, 没食子酸的医用活性得到了广泛研究, 但其农用活性, 特别是对昆虫的生物活性却鲜见研究报道。

本文以印楝素(azadirachtin)为阳性对照, 研究没食子酸对棉铃虫的拒食活性及整个生长发育历程的影响, 在此基础上阐明其机理。以期天然活性成分没食子酸的开发利用提供重要参考, 同时也为棉铃虫的绿色防控提供新视角。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

供试棉铃虫购于河南省科云生物有限公司, 在室内培养箱中用人工饲料继代饲养, 饲养条件为温度(26±1)℃, 相对湿度(70±10)%, 光周期 L//D=14 h//10 h。幼虫生长至 3 龄初期时, 分接于扎孔的养虫管中单头饲养, 在管口上封一层灭菌纸防止其逃逸。化蛹后将蛹取出消毒, 然后放入养虫笼, 成虫羽化后用 10% 蜂蜜水为其补充营养, 并及时更换蜂蜜水。使用白色纱布作为棉铃虫成虫的产卵载体。每天更换纱布, 并将有卵粒的纱布置于新的养虫笼中等待其孵化, 待孵化后按照上述方法继续饲养下一代, 繁衍种群。期间不接触任何化学药剂。

1.2 仪器与试剂

供试药剂: 没食子酸(gallic acid, GA), CAS 号: 149-91-7, 纯度≥98%, 四川省维克奇生物科技有限公司, 结构式见图 1; 印楝素(azadirachtin, Aza), CAS 号: 11141-17-6, 纯度≥98%, 来自华南农业大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 由广东省农业科学院果树研究所资源与环境研究室保存。

佛手柑内酯、茴芹内酯、异茴芹内酯、异欧前胡素、双香豆素、7-甲氧基香豆素、柠檬油素、伞形花内酯、异牡荆黄素、番石榴苷、东莨菪苷、根皮苷、(-)-没食子儿茶素、(-)-表没食子儿茶素、(+)-表儿茶素、香叶木素 7-O-β-D-葡萄糖苷、(±)-儿茶精、(-)-儿茶素、槲皮素、没食子酸甲酯均购自四川省维克奇生物科技有限公司, 纯度均≥98%。

试验前以二甲基亚砜为溶剂将所有化合物配制成 1 g/L 的母液, 置于 4℃ 冰箱内保存。

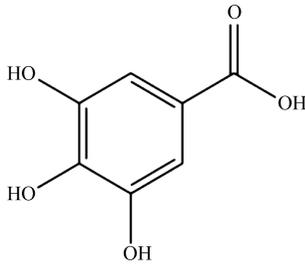


图1 没食子酸结构式

Fig. 1 Structural formula of gallic acid

供试仪器:SPX-250B-G型微电脑光照培养箱购自上海博迅实业有限公司;FB224电子天平(1/10 000)由上海舜宇恒平科学仪器有限公司提供;体视显微镜(MZ101)、显微镜相机(MSX2)购于广州市明美光电技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 21种化合物对棉铃虫的拒食活性测定

采用浸渍叶碟法对棉铃虫进行非选择性拒食测定^[18]。具体过程为:将鲜嫩的甘蓝 *Brassica oleracea* 洗净后晾干,用打孔器打取直径1.3 cm的圆形叶碟备用;将供试化合物使用0.3% tween-80水溶液稀释为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以0.3% tween-80水溶液作为阴性对照,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 印楝素为阳性对照。将叶碟在药液中浸泡8~10 s,取出置于干净玻璃板上自然晾干,以浸湿的脱脂棉包住镊子,用镊子将叶碟置于养虫盒中,每盒1片叶碟,接入10头已饥饿处理4 h的棉铃虫1龄末幼虫,每种化合物重复3盒。放置于温度(26 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(70 \pm 10)%,光周期L//D=14 h//10 h的培养箱中饲养。随时观察对照组叶片取食情况,当阴性对照叶片被取食1/2以上时,立刻向养虫盒中注水,以阻止棉铃虫继续取食。将取食后的叶碟平铺在玻璃板上,做好标记并拍照扫描,扫描分辨率设置为600 dpi,用于计算取食面积。选择初筛结果中拒食活性较好的化合物使用0.3% tween-80水溶液等比稀释成6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5个浓度,以0.3% tween-80溶液为对照,每浓度3次重复,按照上述方法进一步测定其对棉铃虫的拒食活性。

1.3.2 没食子酸对棉铃虫生长发育影响的测定

采用饲料拌毒法测定没食子酸对棉铃虫生长发育的影响^[19]。在40~50 $^{\circ}\text{C}$ 未凝固的饲料中加入没食子酸溶液使其含量为10 $\mu\text{g}/\text{g}$,迅速混匀,待其凝固后备用。以正常饲料为阴性对照。将同一天孵化

的棉铃虫幼虫共1 000头,分别接入拌毒饲料与阴性对照中喂养,每处理3次重复。待其生长至2龄末时,分别选取400头幼虫,转移至扎孔的养虫管中单头饲养,根据情况及时添加新鲜饲料。每天称量并记录棉铃虫的体重直至化蛹结束;成虫羽化后饲喂10%蜂蜜水,每天观察成虫产卵情况并记录;分别随机挑选出300粒卵在50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 没食子酸中浸8~10 s后取出晾干,以0.3% tween-80水溶液作为对照,观察卵孵化情况并记录数据,每组设3次重复。期间每天对其进行拍照。

1.3.3 棉铃虫中肠病理切片

使用含50 $\mu\text{g}/\text{g}$ 没食子酸的饲料饲喂棉铃虫2龄幼虫,48 h后解剖中肠。

石蜡切片观察:在PBS缓冲液中解剖没食子酸处理和对照棉铃虫幼虫($n=10$)中肠,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下使用4%多聚甲醛固定24 h,用70%乙醇小心冲洗若干次。按照石蜡切片法^[20]脱水浸蜡、包埋、切片(4 μm)、苏木素-伊红(HE)双重染色、脱水封片,干燥后用尼康光学显微镜观察拍照。

1.3.4 棉铃虫生长发育相关基因的表达测定

使用50 $\mu\text{g}/\text{g}$ 没食子酸饲料饲喂棉铃虫2龄幼虫,24 h后提取中肠RNA。

RNA提取与cDNA合成:将棉铃虫2龄幼虫的中肠样品置于已灭菌研钵中,用动物总RNA快速抽提试剂盒[B518621,生工生物工程(上海)股份有限公司]提取中肠RNA。质量合格的RNA用逆转录试剂盒(RR047A, TaKaRa)合成cDNA第一链,步骤为:中肠RNA 4 μL , 5 \times PrimeScriptTM RT Master Mix (for Real Time) 2 μL , RNase free ddH₂O 4 μL 。反应条件为:37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 16 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,反应结束后置于一20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

棉铃虫生长发育相关基因的表达分析:利用实时荧光定量PCR(采用ABI QuantStudio 5实时荧光定量PCR系统,赛默飞)分析没食子酸处理后棉铃虫生长发育相关基因的表达,设置3次生物学重复,以Actin为内参基因(表1)。反应体系为:cDNA 1 μL , 2 \times M5 HiPer Realtime PCR Super mix with Low Rox 5 μL , 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 上、下游引物各0.25 μL , RNase Free ddH₂O 3.5 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。

表 1 棉铃虫生长发育相关基因的 RT-qPCR 引物

Table 1 Primers for RT-qPCR of genes related to the growth and development of *Helicoverpa armigera*

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
H-Actin	F:GCGACTTGACCGACTACCTCATG R:GTCACGCACGATTTCCCTCTCAG
H-InR	F:CAAGACGCTGACGCTGGTGAAG R:AAACGCTCGGAATCGCCACATC
H-P53	F:CAGAAATGCGTCTCAGAGTATCC R:TGTCTCGGTGGTGTCTTGATTGTTG
H-Atg 8	F:TGGTGCCATCCGATTTAACAGTTGG R:GGACCCATTGTAGCCGATGTTG
H-G6Pase	F:CCATTCTACTACGGCAGCCATGATG R:TTCCACCACGAGATGTAGCACTTTC

1.4 数据分析

使用 Photoshop CS6 计算取食面积后计算拒食率;使用 DPS 软件计算拒食中浓度 AFC_{50} ;使用 Microsoft Excel 2022 计算棉铃虫幼虫与蛹的体重、化蛹率、羽化率;使用 Origin 2019b 进行绘图;使用 SPSS 21.0 中单因素方差分析和邓肯氏多重比较进行样本之间的差异显著性分析;石蜡切片使用 Case Viewer 2.0 软件进行处理。使用 Primer Premier 5.0 设计引物。

拒食率 = [(对照组取食面积 - 处理组取食面积) / 对照组取食面积] × 100% = [1 - (A - 处理组剩余像素值) / (A - 对照组取食像素值)] × 100%,

其中 A 为空白处理组单个叶碟的像素值;

化蛹率 = 化蛹的试虫数 / 试虫总数 × 100%;

蛹畸形率 = 畸形蛹数 / 总化蛹数 × 100%;

羽化率 = 羽化的试虫数 / 化蛹数 × 100%;

成虫畸形率 = 畸形的成虫数 / 羽化的试虫数 × 100%;

孵化率 = 孵化的卵粒数 / 卵粒总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 酚类化合物对棉铃虫幼虫的拒食活性

通过叶碟试验测定 21 种酚类化合物及阳性对照印楝素对棉铃虫 1 龄末幼虫的拒食活性,初筛浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,检测结果表明,其中 14 种酚类化合物对棉铃虫幼虫不具有拒食活性,而 7-甲氧基香豆素、伞形花内酯、番石榴苷、根皮苷、香叶木素 7-O- β -D-葡萄糖苷、槲皮素、没食子酸等 7 种化合物表现出一定的拒食活性。没食子酸、香叶木素 7-O- β -D-葡萄糖苷和槲皮素在浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下对棉铃虫 1 龄末幼虫的拒食率分别为 50.0%、37.5% 和 25.5% (表 2)。在此基础上进一步检测了这 3 种化合物对棉铃虫 1 龄末幼虫的拒食中浓度,结果表明,槲皮素因拒食活性较差(表 3)未测出 AFC_{50} ,香叶木素 7-O- β -D-葡萄糖苷对棉铃虫的 AFC_{50} 为 72.54 mg/L,没食子酸的 AFC_{50} 为 50.21 mg/L(表 4)。

表 2 21 个酚类化合物对棉铃虫幼虫的拒食活性筛选¹⁾Table 2 Screening for antifedant activity of 21 phenolic compounds against *Helicoverpa armigera* larvae

药剂 Agent	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Concentration	拒食率/% Antifedant rate
佛手柑内酯 5-methoxypsoralen	50	—
茴芹内酯 pimpinellin	50	—
异茴芹内酯 isopimpinellin	50	—
异欧前胡素 isoimperatorin	50	—
双香豆素 dicoumarin	50	—
7-甲氧基香豆素 7-methoxycoumarin	50	1.17
柠檬油素 citropten	50	—
伞形花内酯 umbelliferone	50	0.86
异牡荆黄素 isovitexin	50	—
番石榴苷 guajaverin	50	1.2
东莨菪苷 scopolin	50	—
根皮苷 phlorizin	50	2.3
(-)-没食子儿茶素 (-)-gallo catechin	50	—
(-)-表没食子儿茶素 (-)-epigallocatechin	50	—
(+)-表儿茶素 (+)-epicatechin	50	—
香叶木素 7-O- β -D-葡萄糖苷 diosmetin 7-O- β -D-glucopyranoside	50	37.5
(±)-儿茶精 (±)-catechin	50	—
(-)-儿茶素 (-)-catechin	50	—
槲皮素 quercetin	50	25.5

续表 2 Table 2(Continued)

药剂 Agent	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Concentration	拒食率/% Antifeedant rate
没食子酸 gallic acid	50	50.00
没食子酸甲酯 methyl gallate	50	—
印楝素 azadirachtin	50	70.51
0.3% tween-80	—	—

1) “—”代表无拒食活性。
“—” means no antifeedant activity.

表 3 3 种药剂对棉铃虫幼虫的拒食活性¹⁾

Table 3 Feeding antifeedant activity of three agents against *Helicoverpa armigera* larvae

药剂 Agent	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Concentration	被取食叶碟对应像素值 Pixels of consumed leaf area	拒食率/% Antifeedant rate
香叶木素 7-O- β -D-葡萄糖苷 diosmetin 7-O- β -D-glucoside	CK	(61 016.33±391.78)a	—
	100	(25 045.00±398.00)f	(58.26±0.59)a
	50	(37 952.00±364.40)e	(37.81±0.59)b
	25	(44 074.00±571.13)d	(27.77±1.12)c
	12.5	(54 053.00±962.37)c	(11.41±1.02)d
	6.25	(58 053.67±936.56)b	(4.86±0.99)e
槲皮素 quercetin	CK	(28 922.33±371.03)c	—
	100	(18 410.33±1 355.29)f	(36.35±3.99)a
	50	(21 543.00±651.98)e	(25.51±2.42)b
	25	(25 001.33±474.39)d	(13.56±2.11)c
	12.5	(29 258.67±705.16)b	(-1.16±0.13)d
	6.25	(32 304.67±931.26)a	(-11.69±1.98)e
没食子酸 gallic acid	CK	(127 873.00±137.42)a	—
	100	(23 203.00±668.43)e	(81.85±0.53)a
	50	(63 868.00±221.99)d	(50.05±0.20)b
	25	(99 052.00±854.99)c	(22.54±0.64)c
	12.5	(126 060.00±849.57)b	(1.42±0.57)d
	6.25	(127 385.33±317.63)a	(0.38±0.33)e

1) 对照(CK)为 0.3% tween-80 水溶液。同种药剂处理下不同字母表示不同浓度处理经单因素方差分析和邓肯氏多重比较差异显著($P < 0.05$)。
The control is 0.3% tween-80 in water; The different letters in the same treatment group indicated significant difference among different concentration based on ANOVA and Duncan's multiple comparisons ($P < 0.05$).

表 4 3 种药剂对棉铃虫 1 龄幼虫拒食活性的回归分析¹⁾

Table 4 Regression analysis of antifeedant activity of three agents against *Helicoverpa armigera* 1st-instar larvae

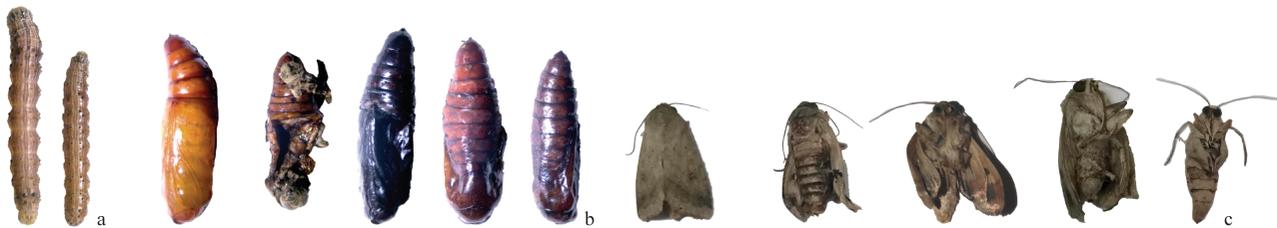
药剂 Agent	斜率±标准误 Slope ± standard error	AFC ₅₀ (95%置信限)/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AFC ₅₀ value (95% confidence interval)	卡方值 Chi-square (df=3)
香叶木素 7-O- β -D-葡萄糖苷 diosmetin 7-O- β -D-glucoside	2.14±1.54	72.54 (54.43~96.67)	4.34
没食子酸 gallic acid	-0.28±3.10	50.21 (32.14~78.44)	0.22
槲皮素 quercetin	—	—	—

1) “—”代表无结果。
“—” means no result.

2.2 没食子酸对棉铃虫生长发育的影响

10 $\mu\text{g}/\text{g}$ 没食子酸对棉铃虫幼虫生长有明显的抑制作用,部分高龄幼虫未能完成蜕皮化蛹过程,导致蛹与成虫畸形(图 2b, c)。没食子酸处理第 8~10 天时与对照组相比,棉铃虫 5~6 龄幼虫的虫重分别下降了 26.85%、26.27%和 19.85%(图 3a)。对照组(正常饲料)的蛹重(0.299 8 g/个)、化蛹率(86.67%)均显著高于没食子酸处理组(蛹重 0.219 9 g/个,化蛹

率为 78.00%),对照组蛹畸形率(9.62%)显著低于没食子酸处理组的蛹畸形率(20.51%)(图 3b, 图 4)。没食子酸处理组棉铃虫羽化率(61.54%)是对照组(88.46%)的 30.43%($P < 0.05$),而成虫的畸形率(25.00%)则是对照(13.04%)的 1.92 倍($P < 0.05$)(图 4)。综上,没食子酸不仅能抑制棉铃虫体重增加,还可降低化蛹率和与羽化率,同时增加蛹和成虫的畸形率,影响棉铃虫的整个生长发育历程。

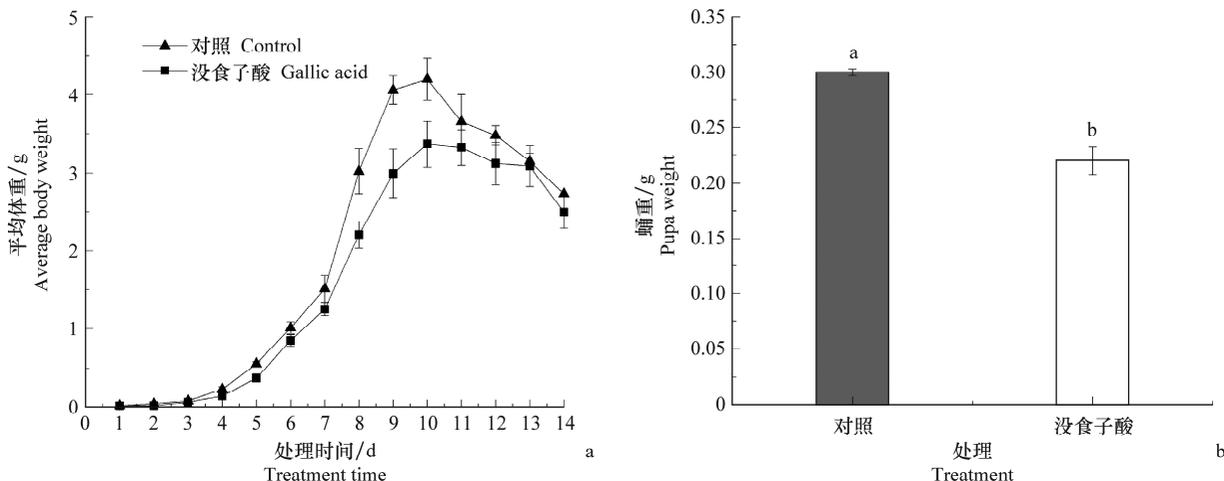


a-c: 没食子酸处理后棉铃虫3龄幼虫、蛹和成虫的形态变化, 左1均为健康对照

a-c: Morphological changes of *H. armigera* 3rd-instar larvae, pupae and adults after gallic acid treatment, left one is the healthy control, respectively

图 2 没食子酸处理引起的棉铃虫形态变化

Fig. 2 Morphological changes of *Helicoverpa armigera* caused by gallic acid

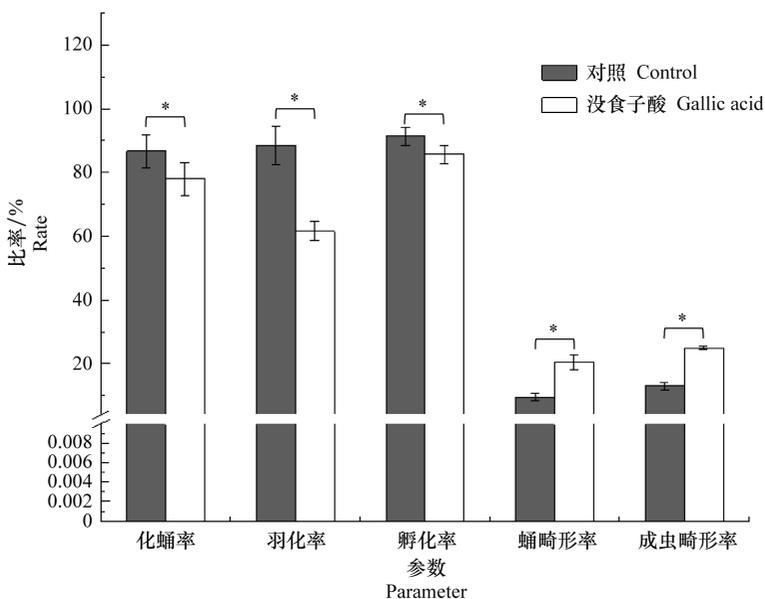


a: 没食子酸处理棉铃虫不同时间后的幼虫体重变化; b: 棉铃虫蛹重。不同字母表示经单因素方差分析没食子酸处理的幼虫体重和对照差异显著 ($P < 0.05$)

a: Changes in body weight of *H. armigera* after treatment with gallic acid for different time; b: Pupa weight of *H. armigera*. The different letters indicated significant difference in pupa weight between gallic acid and control based on One-way ANOVA ($P < 0.05$)

图 3 没食子酸对棉铃虫幼虫的生长发育的抑制

Fig. 3 Inhibition of gallic acid on the growth and development of *Helicoverpa armigera* larvae



*表示经单因素方差分析, 没食子酸处理与对照相比差异显著 ($P < 0.05$)。下同

* indicates significant difference between gallic acid treatment and control by One-way ANOVA ($P < 0.05$). The same applies below

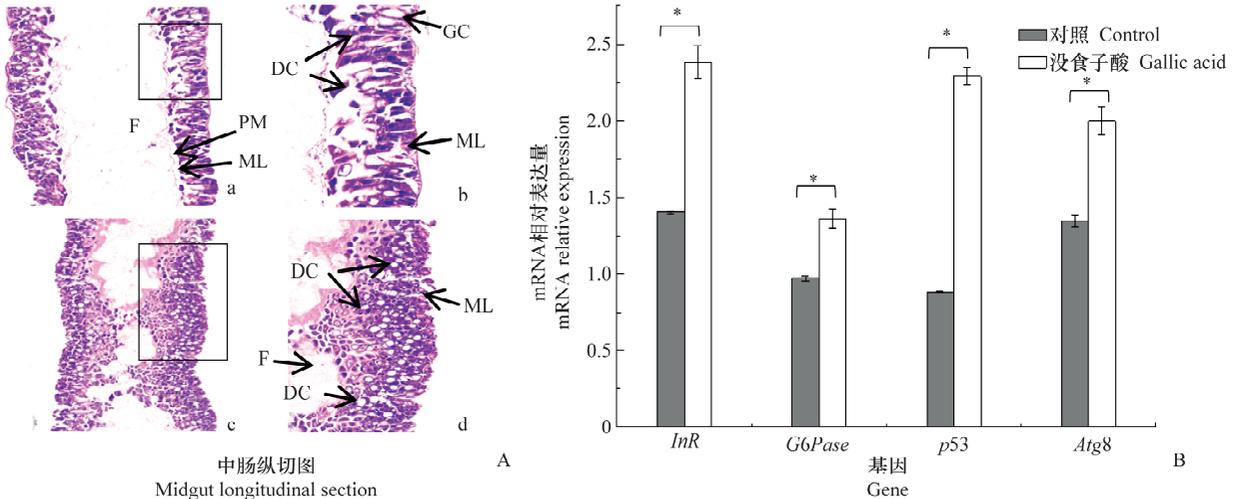
图 4 没食子酸对棉铃虫生长发育的影响

Fig. 4 Effects of gallic acid on the growth and development of *Helicoverpa armigera*

2.3 没食子酸损伤棉铃虫中肠,干扰其营养代谢

用含 50 $\mu\text{g/g}$ 没食子酸的饲料饲喂棉铃虫 2 龄幼虫 48 h 后解剖中肠进行病理检测,发现没食子酸处理组的棉铃虫中肠肠壁增厚,杯状细胞(GC)和消化细胞(DC)膨大并呈现空泡化,整个肠壁上的细胞从肌肉层脱落向内腔挤压,围食膜(PM)细胞严重脱落,导致食物(F)直接与肠壁细

胞接触,中肠细胞大面积凋亡(图 5A)。进一步提取中肠 RNA 进行荧光定量 PCR 检测,结果表明:没食子酸处理后棉铃虫胰岛素受体基因 *InR*、葡萄糖异生基因 *G6Pase*、凋亡指示基因 *p53*、自噬指示基因 *Atg8* 显著上调(图 5B)。说明没食子酸干扰了棉铃虫的营养代谢,与病理切片(HE)检测到的中肠组织损伤相吻合。



A: 经没食子酸处理后的棉铃虫中肠与对照中肠纵切图。a: 正常中肠结构纵切; b: a中方框放大; c: 没食子酸处理后中肠结构纵切; d: c中方框放大。ML: 肌肉层; GC: 杯状细胞; DC: 消化细胞; PM: 围食膜; F: 食物。B: 棉铃虫中肠中营养相关基因表达量

图 5 没食子酸损伤棉铃虫幼虫中肠并干扰营养信号通路

Fig. 5 Damaged midgut of *Helicoverpa armigera* larvae and interfered nutrient signaling pathways by gallic acid

3 结论与讨论

发展植物源农药是目前对害虫进行绿色防控的迫切需求,也是实现乡村绿色振兴的重要举措。植物源农药的活性成分来源于植物,且具有对环境友好、对非靶标生物安全、作用方式独特、不易产生抗性的优点,并兼具杀虫、杀菌、抗逆等功能,是化学农药的理想替代品^[21]。因此,从天然产物中挖掘兼具植物内吸特性的高活性物质,是开发新型植物源农药的关键。

利用植物源活性成分防治棉铃虫的研究层出不穷。孙文琰测定了 24 种植物对棉铃虫的活性,其中儿茶 *Senegalia catechu* 枝条、白头翁 *Pulsatilla chinensis* 根和牡丹 *Paeonia* × *suffruticosa* 根皮 90% 乙醇提取物对棉铃虫的拒食率为 33.22%、10.37%、16.54%^[22];杨雪峰等^[23]测定了质量浓度分别为 0.80% 的岗松精油、桉叶精油、鸦胆子与苦

参碱对棉铃虫的拒食活性,结果显示,其拒食率分别为 52.75%、42.03%、50.57%、52.35%;崔正芳^[24]使用 20 mg/mL 的白花曼陀罗 *Datura metel* 甲醇粗提物处理棉铃虫 2 龄中期幼虫,其 72 h 拒食率为 56.4%;王丽英^[25]用不同溶剂提取苜蓿种子中的活性成分,并测定了提取物对棉铃虫的拒食活性,结果表明,20 mg/mL 甲醇与乙醇提取物对棉铃虫的拒食活性分别为 55.76% 和 52.01%。没食子酸是一类广泛存在于植物界中的多酚类化合物,具有安全性高、易降解、成本低、易获取的特点^[26],并具备多种生物活性,目前广泛应用于食品、医药领域,但对农业害虫的研究与应用却鲜见报道。本研究发现该化合物对棉铃虫幼虫具备显著的拒食活性,同时损伤中肠,干扰其营养代谢,抑制害虫的生长发育。没食子酸的作用方式与作用机理同印楝素类似^[27],虽其活性略低于印楝素,但由于没食子酸成本低且易获得的优势更容易在生产中推广应用。

本文研究中发现没食子酸处理后棉铃虫虫体小于对照组,尤其是 2 龄与 3 龄幼虫,这可能是由于鳞翅目低龄幼虫对药物敏感^[28],龄期愈大,药物的效果愈低,故推荐最佳给药时期为幼虫 3 龄前。本研究中对对照组的棉铃虫在第 10 天时因已进入预蛹期故呈现出体重骤降的现象,而没食子酸处理的棉铃虫出现体重骤减是在给药处理第 12~13 天,证明没食子酸处理可致使棉铃虫化蛹推迟 2~3 d,李春英^[29]用何首乌 *Pleuropterus multiflorus* 干粉饲喂棉铃虫幼虫,发现其幼虫期延长 5 d。没食子酸处理后化蛹率、羽化率、孵化率均显著降低,而蛹与成虫的畸形率显著增加,部分高龄幼虫甚至无法完成蜕皮化蛹,这可能是由于没食子酸抑制了棉铃虫的营养吸收,从而使其无法储存足够营养供幼虫生长发育与蜕皮化蛹,这与棉铃虫中肠损伤及营养相关基因上调相吻合。

本研究明确了没食子酸对棉铃虫具有良好的拒食活性,同时损伤中肠、干扰营养代谢途径,抑制了棉铃虫的生长发育。没食子酸作为天然活性成分,且安全、无毒易降解、成本低、易获得等优点,具备开发成为植物源农药的巨大潜力。但鉴于活性较低,后续可进一步研究没食子酸与化学农药混配,达到药物活性与安全性的平衡,并进行田间防效试验,以为棉铃虫的绿色防控提供新的思路。

参考文献

- [1] 宋唯伟,马英,王艳,等. 棉铃虫的味觉研究进展[J]. 华中昆虫研究, 2018, 14: 64-70.
- [2] 李云瑞. 农业昆虫学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 192-196.
- [3] 饶楠,梁雪娜,夏红英,等. 10 亿 PIB/mL 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒悬浮剂防治棉铃虫和小菜蛾田间药效试验[J]. 农药, 2018, 57(5): 377-379.
- [4] 唐睿,孙宪银,卓富彦,等. 近 5 年中国棉花主要病虫害发生演替及防控分析[J]. 新疆农业科学, 2021, 58(12): 2208-2219.
- [5] 黄云,吴沛卓,郑钧月,等. 棉铃虫对化学杀虫剂的抗性现状及分子机制研究进展[J]. 植物保护学报, 2022, 49(1): 336-350.
- [6] 徐汉虹,赖多,张志祥. 植物源农药印楝素的研究与应用[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(4): 1-11.
- [7] 吴益东,管放,沈慧雯,等. 我国棉铃虫对 Bt 蛋白 Cry1Ac 抗性现状及分子机制研究进展[J]. 植物保护学报, 2021, 48(5): 958-963.
- [8] 刘昱,张培通,陈兵林,等. 转 Bt 基因棉与棉田绿盲蝽趋性有关的生理特征分析[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(2): 243-247.
- [9] 柯发敏,张开莲. 没食子酸的研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(4): 440-442.
- [10] 张全宇,徐宏建,王丽华,等. 没食子酸对断奶前犊牛生长性能及血浆生化、抗氧化和免疫指标的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(4): 2496-2503.
- [11] 蔡龙,李习龙,蒋显仁. 没食子酸的生物学功能及在畜禽生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2019, 31(1): 102-108.
- [12] 李黔柱. 以没食子酸为先导合成 1,2,4-三唑衍生物及抗菌和抗病毒活性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2009.
- [13] 郑雪花,杨君,杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 94-98.
- [14] 张雅丽,李建科,刘柳. 没食子酸的体外抑菌作用研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(11): 81-84.
- [15] 汪镡豪,魏昌英,谢慧婷,等. 抑制水稻细菌性条斑病菌的没食子酸分离及其对水稻细菌性条斑病的防治作用[J]. 广西植物, 2018, 38(1): 119-127.
- [16] HE Zhiping, CHEN A Y, ROJANASAKUL Y, et al. Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1 α /VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2016, 35(1): 291-297.
- [17] 李玲,刘湘丹,詹济华,等. 卷丹百合化学成分抗肿瘤活性研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(10): 1133-1136.
- [18] 张余杰,秦小萍,周平,等. 坡柳皂苷对棉铃虫生长发育的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 103-105.
- [19] 吴文君. 天然产物杀虫剂——原理·方法·实践[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998: 56.
- [20] 黄志君,钟仰进,邓小娟,等. 家蚕中肠与丝腺变态发育的组织切片观察[J]. 华南农业大学学报, 2006(2): 100-103.
- [21] 杨欣蕊,廖艳凤,赵鹏飞,等. 植物源农药及其开发利用研究进展[J]. 南方农业, 2022, 16(11): 33-36.
- [22] 孙文琰. 24 种植物对棉铃虫、粘虫杀虫活性的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [23] 杨雪峰,张皓添,陈晓萱,等. 四种天然产物对棉铃虫杀灭效果研究[J]. 黑龙江粮食, 2022(4): 57-63.
- [24] 崔正芳. 白花曼陀罗提取物杀虫活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [25] 王丽英. 苜蓿种子初提物对棉铃虫生物活性研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2005.
- [26] 史海燕,郝艳丽. 没食子酸生物活性研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(2): 146-149.
- [27] 程东美,张志祥,田永清,等. 印楝杀虫作用机理[J]. 植物保护, 2007, 33(4): 11-15.
- [28] 车午男. 甜菜夜蛾对甲维盐抗性的特性及抗性机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [29] 李春英. 何首乌对棉铃虫杀虫活性的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2011.