

印楝素、闹羊花素—Ⅲ对斜纹夜蛾的生物活性及作用机理的研究*

李晓东 陈文奎 胡美英

(华南农业大学昆虫毒理室, 广州, 510642)

摘要 本试验通过室内生物测定证实印楝素、闹羊花素—Ⅲ对斜纹夜蛾幼虫具毒杀、拒食、抑制生长发育的活性。放射免疫测定表明印楝素对试虫的蜕皮甾类滴度, 促前胸腺激素活性有抑制作用, 导致生长发育受阻。本文还对印楝素作用于斜纹夜蛾的机理做了初步探讨。

关键词 印楝素; 闹羊花素—Ⅲ; 斜纹夜蛾; 蜕皮甾类; 促前胸腺激素 (PTTH)

中图分类号 S482.39

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura* (F.)) 为世界性害虫。由于其食性杂, 具暴食性, 是重要的农业害虫之一。

对斜纹夜蛾及其他重要害虫的化学防治, 由于传统杀虫剂的抗性, 公害等问题, 人们越来越倾向于从天然产品中寻找更有效, 更安全的杀虫物质, 以开发新型杀虫剂。

印楝素、闹羊花素—Ⅲ 分别是从小楝树种 (*Azadirachta indica*), 黄杜鹃花 (*Rhododendron melle* G.Don) 中提取而得的物质。印楝素对多种害虫具高效的拒食、干扰胚后发育等生物活性 (Schmutterer, 1990)。闹羊花素—Ⅲ 亦对多种农业害虫具显著的胃毒、触杀及熏杀作用 (赵善欢等, 1982)。印楝素对斜纹夜蛾的生物活性作用研究前人已做了不少工作 (Koul, 1987), 但关于抑制生长发育方面的作用及机理则很少。闹羊花素—Ⅲ 情况亦同。因此, 本试验测试了两种植物杀虫剂对斜纹夜蛾的生物活性及以试虫内分泌激素为作用靶标的效用, 试图为开发新型植物杀虫剂提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 药剂 印楝素 (Azadirachtin) 95% 结晶, 用丙酮溶解。闹羊花素—Ⅲ (Rhodojaponin—Ⅲ) 95% 结晶, 以 75% 乙醇溶解。两种药剂均由美国 NPI 提供。

1.1.2 供试昆虫 斜纹夜蛾幼虫, 采自广州市效田间, 室内以鲜木薯叶饲养, 于 25℃, L:D=16:8, R-H=70%~80% 条件下繁殖供试。

1.1.3 测试仪器 RIA 药盒 (上海昆虫研究所); FT-613 型自动计算 ¹²⁵I 放免测量仪; LI-3000 型叶面积测定仪。

1.2 试验方法

1.2.1 毒杀作用 用微量注射器体腔注射五龄幼虫, 每头 1 μL, 对照注射等量溶剂。逐日记录生长发育及死亡情况。

1994-06-03 收稿

* 国家自然科学基金资助项目

1.2.2 生长发育抑制作用 试虫及药剂处理同上。用电子天平逐日称重至化蛹,记录其体重变化情况。

1.2.3 拒食作用 以饥饿3~4 h后的四龄幼虫供试。叶碟为 $d=2\text{ cm}$ 的木薯叶片制成,于试药液中浸1~2 s后晾干(对照浸以溶剂),24 h后用叶面积测定仪测其取食面积。

1.2.4 干扰内分泌作用 血淋巴的收集及血淋巴 PTTH 的抽提:体腔注射药剂处理试虫,从六龄0 h起,按一定时间间隔收集血淋巴,每虫 $20\text{ }\mu\text{L}$,低温保存。抽提 PTTH 部分的血淋巴则经2 min沸水浴后,高速($10\text{ }000\text{ g}$)离心(5 min),上清液冷冻保存供下步试验用。

血淋巴 PTTH 滴度测定:摘取对照六龄50 h幼虫完整的前胸腺(此时分泌率低),于24孔组织培养板中培养。不同处理滴加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 不同处理的血淋巴 PTTH 粗提物,以测定它们的 PTTH 滴度差异。培养方法见(郭素堂等,1992)。培养后收集全部培养液连同上步的血淋巴供 RIA 测定。方法按曹梅讯(1986)。

血淋巴蛋白质含量的测定:取上述对照与处理试虫的血淋巴,用 Folin－酚法测定。

2 结果与分析

2.1 毒力作用

用两种药剂对斜纹夜蛾5龄幼虫处理的结果表明:印楝素与闹羊花素－Ⅲ对斜纹夜蛾5龄幼虫都表现较强的毒杀活性。如表1所示,印楝素的活性高于闹羊花素－Ⅲ,而且两种药剂处理后第4 d的 LD_{50} 又显著低于第3 d的。据观察,闹羊花素－Ⅲ处理后试虫有兴奋、扭曲身体现象,短时间被击倒,而后逐渐恢复。但两者的作用都是缓效的,24 h内各种浓度处理后死亡率都很低,72 h后才表现明显药效。

表 1 印楝素、闹羊花素－Ⅲ 对 5 龄幼虫毒力测定⁽¹⁾

药 剂	处理后天数	回归方程	相关系数(r)	$\text{LD}_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{虫}^{-1}$
印楝素	3	$Y=4.325\text{ }5+1.325\text{ }6X$	0.942 0	3.2
	4	$Y=4.730\text{ }8+1.321\text{ }7X$	0.991 7	1.6
闹羊花素－Ⅲ	3	$Y=3.354\text{ }7+1.296\text{ }9X$	0.977 5	18.6
	4	$Y=3.906\text{ }0+0.964\text{ }7X$	0.927 3	13.6

(1)每处理设3重复(45头虫)。

2.2 生长抑制作用

药剂处理的5龄幼虫经3 d的生长至化蛹,其体重增长倍数变化如表2所示。处理后24 h,试虫的体重增长倍数与对照比差异显著(印楝素 $0.25\text{ }\mu\text{g}$ 组除外)。印楝素处理随剂量的提高,试虫生长受抑程度增大。48 h后,两种药剂高剂量组试虫体重增长率与对照差异显著,72 h后则均与对照组无差异。(因此时对照组已化蛹,无法确切比较)。

2.3 拒食作用

两种药剂对4龄幼虫非选择性拒食作用测定表明:印楝素的拒食中浓度为 $1.1\times 10^{-4}\%$,闹羊花素－Ⅲ的为 $40.5\times 10^{-4}\%$,如表3所示,都对试虫表现出较强的拒食活性,印楝素的尤为强烈。

2.4 血淋巴蛋白质含量

结果如表4所示,经印楝素,闹羊花素－Ⅲ处理的试虫其血淋巴蛋白质合成动态显著

表 2 印楝素、闹羊花素-Ⅲ 对 5 龄幼虫生长发育抑制作用⁽¹⁾

处 理	剂量 / $\mu\text{g}\cdot\text{虫}^{-1}$	增长倍数/%		
		24 h	48 h	72 h
对 照	—	1.1a	2.5 a	3.2 a
	1	0.35c	1.4 ab	2.6 a
闹羊花素-Ⅲ	10	0.30c	1.25b	2.8 a
	20	0.6 bc	1.85b	3.6 a
	0.25	0.85ab	2.6 a	2.9 a
印楝素	1	0.35c	1.1 b	2.7 a
	4	0.25c	0.8b	1.25 b

(1) 数据为 3 个重复的平均值(共 15 头)。
数据后标相同字母者,表示经 DMRT 检定,于 5% 水平上无显著差异。
增长倍数 = (每日所称体重 - 原始体重) / 原始体重

表 3 印楝素、闹羊花素-Ⅲ 对 4 龄幼虫的拒食作用 (24 h)⁽¹⁾

试 药	回归方程	相关系数 (r)	$\frac{\text{AFC}_{50}}{(\times 10^{-4} \%)}$	$\frac{\text{AFC}_{95}}{(\times 10^{-4} \%)}$
闹羊花素-Ⅲ	$Y=3.544\ 4+0.905\ 3X$	0.974 3	40.5	2 658
印楝素	$Y=4.952\ 4+1.003\ 7X$	0.953 0	1.1	48.6

(1) 每处理设 10 次重复;拒食率 (%) = $(S_{\text{CK}} - S_{\text{T}}) / S_{\text{CK}} \times 100$
S:取食面积 CK:对照组, T:处理组

表 4 印楝素、闹羊花素-Ⅲ 对 6 龄幼虫血淋巴蛋白质合成作用⁽¹⁾

处 理	剂 量 ($\mu\text{g}/\text{虫}$)	蛋白质含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$							
		0h	30 h	50 h	70 h	80 h	90 h	100 h	110 h
对照	—	1.64 a	1.93 a	4.95 a	6.30 a	7.05 a	7.24 a	4.43 a	4.19 a
印楝素	10	1.58 a	0.64 c	1.96 c	4.03 b	3.03 c	5.48 b	2.56 b	3.56 c
闹羊花素-Ⅲ	20	1.69 a	1.33 b	3.72 b	3.66 c	3.63 b	2.27 c	4.85 a	6.17 a

(1) 表中数据为 3 个重复的平均数;
数据后标相同字母者,表示经 DMRT 检验后于 5% 水平上无显著差异。

区别于对照。处理后 30 h 差异均达显著水平。至蜕皮后 90 h, 对照组蛋白质合成量达峰值, 为 7.24 mg/g, 此时印楝素处理组虽也达峰值, 但仅为 5.48 mg/g, 而闹羊花素-Ⅲ 处理组的峰值出现则被推迟至蜕皮后 110 h, 值为 6.19 mg/g。

2.5 血淋巴蜕皮甾类滴度

如图 1 所示, 整体水平上, 处理组的血淋巴蜕皮甾类滴度低于对照组。蜕皮后 80 h (预蛹阶段), 对照出现峰值 (1 234 $\mu\text{g}/\text{L}$), 而两种药剂处理组出峰时间都推

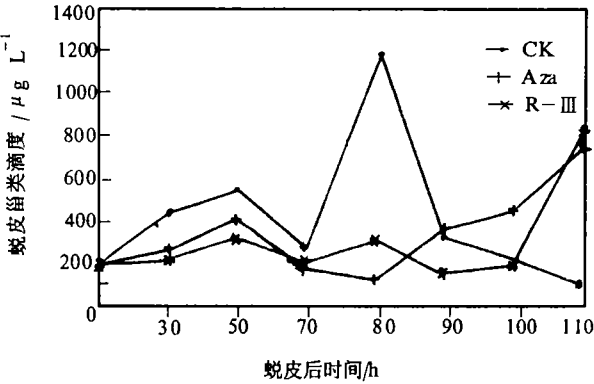


图 1 两种药剂对六龄幼虫血淋巴蜕皮甾类的影响
Aza: 印楝素; R-Ⅲ: 闹羊花素-Ⅲ; CK: 对照

迟至蜕皮后 110 h, 且峰值低于对照, 分别为 792 $\mu\text{g/L}$, 883 $\mu\text{g/L}$, 差异显著。

2.6 血淋巴 PTTH 滴度

本试验以试虫六龄幼虫血淋巴粗 PTTH 抽提物对前胸腺的激活率来衡量 PTTH 的滴度。如图 2 所示, 印楝素处理组血淋巴 PTTH 对前胸腺的激活率显著低于对照组。对照的激活率峰值为 75%, 出现时间为蜕皮后 80 h, 而处理组为 56%, 时间推迟至 110 h。这表明受处理的试虫其血淋巴内 PTTH 的含量低于对照, 而且 PTTH 释放于血淋巴内的时间也被延迟。

3 结论与讨论

3.1 毒杀作用

许多研究表明, 印楝素对多种害虫有拒食、触杀、胃毒、抑制生长发育和影响卵巢发育的作用 (Schmutterer, 1990)。本试验以不同剂量处理斜纹夜蛾五龄幼虫, 使其化蛹比对照推迟 2~3 d, 且成虫出现不同程度的畸形。高剂量下幼虫取食受抑, 活力降低, 易受病毒感染致死。而且, 随处理剂量的提高, 试虫体重的增长受抑程度增加, 表明印楝素抑制斜纹夜蛾幼虫的生长发育, 且此作用为一种剂量依赖关系。类似情况在其他虫种亦有出现, 如丽蝇 (Wilp, 1986)。印楝素对斜纹夜蛾幼虫同样具有强烈的拒食作用。有研究证明其作用机理为影响昆虫口器的化学感受器, 阻止神经传导抑制神经原发出刺激取食信号的起动 (Schoonhoven et al, 1977)。与印楝素相比, 闹羊花素-Ⅲ不但具拒食作用, 其触杀作用更为显著, 注射后短时间内试虫会被击倒, 这在马铃薯甲虫和草地夜蛾上有相同现象 (胡美英等, 1992)。从毒杀测试中可以肯定, 两者都是缓效作用。

3.2 对血淋巴蛋白质的作用

昆虫血淋巴含有多种蛋白质, 它们在变态重组组织, 卵巢发育, 运输脂类、激素, 作为酶类及免疫等方面起着重要的作用。故血淋巴中蛋白质的含量不正常势必影响昆虫的生长发育。印楝素、闹羊花素-Ⅲ处理斜纹夜蛾幼虫, 其血淋巴蛋白质含量在整个末龄期总体水平上低于对照, 特别在变态前期 (90 h) 差异显著, 说明两种试剂干扰了试虫的蛋白质合成。实质上这种干扰作用是通过干扰内分泌激素的干扰, 影响脂肪体合成蛋白质的能力。印楝素处理亚洲玉米螟致使脂肪体呈融蜡状 (赵善欢等, 1985) 亦说明印楝素对脂肪体有作用, 是否脂肪体为其作用靶标还有待于进一步的研究。

3.3 对血淋巴蜕皮甾类及 PTTH 滴度的作用

控制昆虫变态发育主要是由 PTTH、蜕皮激素、保幼激素 3 种激素相互协调、制约发挥作用。昆虫脑神经分泌细胞合成、分泌 PTTH 经咽侧体释放于血淋巴至靶标如前胸腺, 激

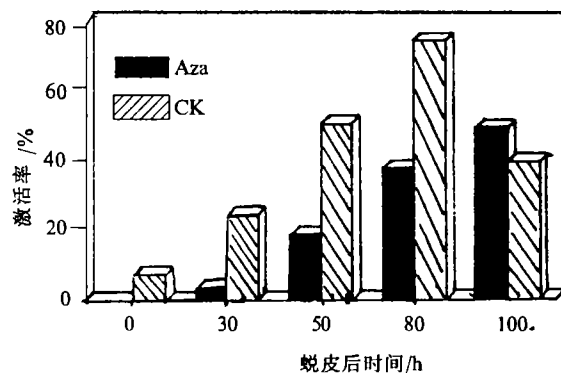


图2 印楝素对斜纹夜蛾六龄幼虫血淋巴 PTTH 滴度的作用

$$Ar(\text{激活率}) = (Aha - Ahb) / Aga$$

Aha: 左尾前胸腺于 PTTH 粗提物培养后的蜕皮甾类滴度

Aha: 右尾前胸腺于 Grace 液培养后的蜕皮甾类滴度

Ahb: PTTH 粗提物内蜕皮甾类滴度 (消除本底)

活前胸腺合成蜕皮甾类。蜕皮激素协同保幼激素调控昆虫变态发育(Bollenbacher, 1988)。如这一过程受扰,则昆虫的变态发育受阻。不少研究认为印楝素抑制了PTTH在昆虫脑中的合成与释放,降低了前胸腺对PTTH的感受性,蜕皮甾类的合成与分泌因此受抑(Schmutterer, 1990; Subrahmanyam et al, 1989)。本试验中处理试虫的蜕皮甾类滴度与PTTH激活率明显低于对照,决定其变态化蛹的蜕皮峰出现被延迟。处理试虫的低PTTH激活率表明PTTH合成、分泌量不足,是印楝素干扰了脑神经分泌物在脑的合成、释放(Subrahmanyam et al, 1989)及在心侧体的转运和释放(Rembold, 1989)。故脑神经分泌细胞、心侧体、前胸腺、脂肪体等都可能是印楝素的作用靶标。可以推想:印楝素对斜纹夜蛾幼虫生长发育的影响主要是对与生长发育重要相关的激素如PTTH、蜕皮甾类等的合成、分泌、输送至靶标的过程有阻碍、抑制作用。

本研究中闹羊花素-Ⅲ对试虫的蜕皮甾类滴度也有抑制,致使化蛹推迟,无疑它也具有抑制生长发育的活性,但同时具击倒作用。有研究表明闹羊花素-Ⅲ对菜青虫的AChE有抑制作用(冯夏等, 1990),也即阻碍神经冲动在神经纤维上的传导。对于内分泌激素的输送和神经纤维的冲动传导的抑制孰为主导作用抑或兼而有之,则需进一步的研究。

参 考 文 献

- 冯 夏,赵善欢.1990.黄杜鹃提取物对几种害虫的生物活性及其作用机理的初步研究.华南农业大学学报,11(2):68~76
- 赵善欢,张 兴.1982.植物杀虫剂对水稻三化螟的拒食及内吸毒力试验.中国农业科学,(2):56~62
- 赵善欢,黄端平,张 兴.1985.楝科植物对亚洲玉米螟幼虫取食和生长发育的影响.昆虫学报,28(4):450~453
- 胡美英,赵善欢.1992.黄杜鹃花杀虫活性成份及其对害虫毒杀作用的研究.华南农业大学学报,13(3):9~15
- 郭素堂,刘瑞林,蒋容静,等.1992.亚洲玉米螟末龄幼虫促前胸腺激素与蜕皮甾类激素滴度的变化.昆虫学报,35(1):15~35
- 曹梅讯.1986.20-羟基蜕皮酮放射免疫分析法.昆虫知识,23(2):87~90
- Bollenbacher W E. 1988. The interendocrine regulation of larval-pupal development in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. A Model J Insect Physiol, 34(10):947~948
- Koul O. 1987. Antifeedant and growth inhibitory effects of calamns oil and neem oil on *Spodoptera litura*. Nuclear Laboratory Conference Phytoparasitica, 15(3):169~180
- Rembold H. 1989. Corpus cardiacum--a target for azadirachtin. Experientia 45:361~363
- Schmutterer H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree *Azadirachta indica*. Ann Rev Entomol. 25:271~297
- Schoonhoven L M, Jermy T. 1977. A behavioral and electrophysical analysis of insect-feeding deterrents. In: Mcfarlane N R, ed. Crop Protection Agents Their Biological Evaluation. New York: Academic, 133~140
- Subrahmanyam B, Rembold H. 1989. Effect of Azadirachtin-a on neuroendocrine activity in *Locust migratoria*. Cell Tissue Res, 256(3):513~518

Wilp S H.1986. Growth and adult molting of larvae and pupae of the blowfly *Phormia terrac-novae* in relationship to azadirachtin concentrations. In: Schmutterer H, Ascher K R S. eds. Natural pesticides from the Neem tree and other Tropical Plants. Dt Ges für Techn Zusammenarbeit (GTZ): GmbH Comp, 299 ~ 314

STUDIES ON THE EFFECTS AND MECHANISMS OF AZADIRACHTIN AND RHODOJAPONIN—Ⅲ ON *Spodoptera litura* (F.)

Li Xiaodong Chen Wenkui Hu Meiyang

(Lab. of Insect Toxicology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The effects of azadirachtin and rhodojaponin—Ⅲ on the larvae of *Spodoptera litura* (F.) were tested by bioassays. The results indicated that both phytochemicals had the properties of contact poison, antifeedant and growth inhibition on the experimental insects. Radio immune assay test showed that azadirachtin inhibited the titres of endocrine hormones, inducing the growth—inhibition on the treated insects. The mechanism of action of azadirachtin was also preliminarily discussed in this paper.

Key words azadirachtin; rhodojaponin—Ⅲ ; *Spodoptera litura*; ecdysteroid; prothoracicotropic hormone (PTTH)