

基于均匀设计法评价龙牙草提取液对桃蚜的生物活性

乔淑芬¹, 刘春雷², 顾地周^{1*} (1. 通化师范学院生物系, 吉林通化 134002; 2. 吉林省通化市第二十中学, 吉林通化 134001)

摘要 [目的] 为将龙牙草用于农业害虫防治奠定基础。[方法] 分别采用浸渍法和浸叶法测定了龙牙草叶的乙醇、丙酮浸提液和水蒸汽蒸馏液对桃蚜的触杀和拒食作用, 并应用均匀设计法对测定结果进行了分析。[结果] 24 h 的毒力回归方程表明, 乙醇浸提液和水蒸汽蒸馏液对桃蚜有较好的触杀作用且乙醇浸提液的触杀作用大于水蒸汽蒸馏液。48 h 后仅乙醇浸提液对桃蚜仍有较好的触杀作用, 当乙醇浸提液的质量浓度为 25.0 mg/ml 时, 其校正死亡率达 94.3%, $LC_{50} = 8.5470$ mg/ml。24 h 的毒力回归方程表明, 3 种药液对桃蚜的拒食作用大小为: 水蒸汽蒸馏液 > 乙醇浸提液 > 丙酮浸提液。48 h 后仅水蒸汽蒸馏液对桃蚜仍有显著的拒食作用且其 AFC_{50} 值为 10.2121 mg/ml。[结论] 龙牙草中含有对桃蚜具有显著生物活性的物质, 主要表现在对桃蚜的触杀和拒食作用。

关键词 龙牙草; 桃蚜; 均匀设计; 生物活性

中图分类号 S436.621.2⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)31-15292-02

Evaluation on the Biological Activity of Extracted Liquid from *Agrimonia pilosa* against *Myzus persicae* on the Basis of Uniform Design

QIAO Shu-fen et al (Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002)

Abstract [Objective] The purpose of the research was to lay a foundation for applying *Agrimonia pilosa* in controlling agricultural pests. [Method] The contact toxicities and antifeedant effects of ethanol and acetone extracted fluid and steam distilled fluid from *A. pilosa* leaves on *Myzus persicae* were determined by immersion method and leaf soaking method resp. and the determination results were analyzed by uniform design method. [Result] The toxicity regression equation of 24 h showed that the ethanol extracted fluid and steam distilled fluid had better contact toxicities on *M. persicae* and the contact toxicity of ethanol extracted fluid was stronger than that of steam distilled fluid. After 48 h, only ethanol extracted fluid still had better contact toxicity on *M. persicae* and when the mass concn. of ethanol extracted fluid was 25.0 mg/ml, its corrected mortality was up to 94.3% and its value of LC_{50} was 8.5470 mg/ml. The toxicity regression equation of 24 h showed that the antifeedant effects of the 3 herb liquors on *M. persicae* were as follows: steam distilled fluid > ethanol extracted fluid > acetone extracted fluid. After 48 h, only steam distilled fluid still had significant antifeedant effect on *M. persicae* and its value of AFC_{50} was 10.2121 mg/ml. [Conclusion] There was substance with significant bioactivity on *M. persicae* in *A. pilosa* and it was mainly shown in its contact toxicity and antifeedant effect on *M. persicae*.

Key words *Agrimonia pilosa*; *Myzus persicae*; Uniform design; Biological activity

龙牙草(*Agrimonia pilosa* Ledeb.) 又称仙鹤草, 蔷薇科龙牙草属多年生耐寒草本植物, 为重要野生药用植物。目前对龙牙草的研究主要集中在化学成分和药理活性, 但对其用于农业害虫防治至今未见报道^[1-2]。笔者采用不同的活性测试方法研究龙牙草叶的乙醇、丙酮浸提液及水蒸汽蒸馏液对桃蚜生物活性的影响。应用均匀设计法对数据进行分析和处理, 以期缩短研究周期并减少试验次数。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试植物。龙牙草采自吉林省通化白鸡腰国家级自然保护区。

1.1.2 供试昆虫。桃蚜捕自通化师范学院附近蔬菜田内, 选择健康、大小均匀的桃蚜供试。

1.2 药液制备及制备方法 称取龙牙草的叶 3 份, 每份 10 g, 其中 2 份分别加入 50 ml 乙醇和丙酮, (25 ± 2) °C 恒温振荡提取 6 h。另外 1 份用蒸馏水浸泡 12 h 后进行水蒸汽蒸馏 3 次, 均用 2 层纱布过滤 3 次, 将 3 次水馏液混合后直接定容。乙醇、丙酮浸提液的滤液减压浓缩后分别加入少量 95% 乙醇溶解后以蒸馏水定容, 3 种药液均制备成质量浓度为 10.0、12.5、15.0、17.5、20.0、22.5、25.0 mg/ml 备用。

1.3 试验设计

1.3.1 触杀作用测定。采用浸渍法^[3-4], 将桃蚜放入自制的小培养皿状滤网中, 浸没于不同浓度乙醇、丙酮浸提液和水

蒸汽蒸馏液(3 种药液均加入少量的吐温-80 或洗衣粉作为表面活性剂, 以确保药液与桃蚜充分接触) 中处理 10 s 后迅速取出, 置于有鲜嫩蔬菜叶的烧杯(500 ml, 杯底垫有保湿滤纸 3 层) 中, 每个处理 30 只桃蚜, 重复 3 次, 对照分别用 30% 的乙醇、丙酮和蒸馏水做同样处理。将烧杯置于温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 60% ~ 75%, 光照强度 600 lx 的培养箱内观察, 于 24、48 h 后观察桃蚜的死亡情况, 计算死亡率、校正死亡率和致死中浓度 (LC_{50})。计算公式为: 死亡率 (%) = (死亡虫数/供试总虫数) × 100; 校正死亡率 (%) = [(处理组死亡率 - 对照组死亡率)/(1 - 对照组死亡率)] × 100。

1.3.2 拒食作用测定。采用浸叶法^[5], 将鲜嫩的蔬菜叶用打孔器打成叶碟(直径为 3.0 cm), 放入供试药液中浸泡 15 s, 取出用吸水纸吸干叶碟表面药液后放入垫有 3 层保湿滤纸的烧杯中, 每杯 1 片叶碟, 于叶片中央接入已饥饿 6 h 的桃蚜 10 只, 每个处理 30 只桃蚜, 重复 3 次, 对照分别用 30% 的乙醇和蒸馏水做同样处理。将烧杯置于温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 60% ~ 75%, 光照强度 600 lx 的培养箱内观察, 24 h 后统计对照组和处理组叶碟上蚜虫栖息数, 48 h 后再次统计栖息数。计算栖息率和拒食率。根据平均栖息率计算出拒食率和拒食中浓度 (AFC_{50})。计算公式为: 栖息率 (%) = (处理组蚜虫栖息数/每个处理蚜虫总数) × 100; 拒食率 (%) = [(对照组蚜虫栖息数 - 处理组蚜虫栖息数)/每个处理蚜虫总数] × 100。

1.4 数据分析与处理 采用均匀设计(Uniform Design)软件, 回归分析均采用全回归。

基金项目 吉林省教育厅自然科学基金项目 [(2003)-65]。

作者简介 乔淑芬(1962-), 女, 吉林通化人, 副教授, 从事昆虫生理研究。* 通讯作者。

收稿日期 2009-06-29

2 结果与分析

测定龙牙草不同浓度的乙醇、丙酮浸提液和水蒸汽蒸馏液对桃蚜触杀和拒食作用,为快而准确的判断出 3 种药液对桃蚜触杀和拒食作用的显著性,采用均匀设计法^[6],同时考

察不同浓度的乙醇、丙酮浸提液和水蒸汽蒸馏液对桃蚜的触杀致死率和拒食率的影响,结果如表 1 所示。回归分析结果如表 2 所示。

表 1 U₁₀(10³)均匀设计试验结果
Table 1 U₁₀(10³) uniform design test results

Table with 8 columns: 处理/Treatment, X1//mg/ml, X2//mg/ml, X3//mg/ml, Y1//%, Y2//%, Y3//%, Y4//%. Rows 1-10 showing experimental data for different concentrations of ethanol, acetone, and water vapor distillate extracts.

注: X₁ 为乙醇浸提液质量浓度, X₂ 为丙酮浸提液质量浓度, X₃ 为水蒸汽蒸馏液质量浓度, Y₁ 为 24 h 触杀致死率, Y₂ 为 24 h 拒食率, Y₃ 为 48 h 触杀致死率, Y₄ 为 48 h 拒食率, 括号内数值分别代表 Y₁、Y₃ 在 24 h 和 48 h 的校正触杀致死率。

Note: X₁, The mass concentration of ethanol extracts; X₂, The mass concentration of acetone extracts; X₃, The mass concentration of wetdistillation liquid; Y₁, The contacting death rate after 24 h; Y₂, The antifeedant rate after 24 h; Y₃, The contacting death rate after 48 h; Y₄, The antifeedant rate after 48 h; The data in the brackets stand for the corrected contacting death rate after 24 h and 48 h.

表 2 龙牙草对桃蚜的触杀和拒食活性回归分析结果

Table 2 Regression analysis results for the contacting and antifeedant activities of Myzus persicae from Agrimonia pilosa Ledeb.

Table with 10 columns: 时间/Time h, 触杀活性/Activity of contacting (毒力回归方程, 复相关系数 R, 标准差 s, 检验值 Ft), 拒食活性/Antifeedant activity (毒力回归方程, 复相关系数 R, 标准差 s, 检验值 Ft). Rows for 24h and 48h.

注: 样本容量 N = 10, 显著性水平 α = 0.05; 24 h 触杀临界值 F_(0.05,2,7) = 4.737, Ft > F_(0.05,2,7); 48 h 触杀临界值 F_(0.05,1,8) = 5.318; 24 h 拒食临界值 F_(0.05,3,6) = 4.757, Ft > F_(0.05,3,6); 48 h 拒食临界值 F_(0.05,1,8) = 5.318, Ft > F_(0.05,1,8)。

Note: N = 10; α = 0.05; The critical contacting for 24 h F_(0.05,2,7) = 4.737 and Ft > F_(0.05,2,7); The critical contacting value for 48 h F_(0.05,1,8) = 5.318; The critical antifeedant value for 24 h F_(0.05,3,6) = 4.757, and Ft > F_(0.05,3,6); The critical antifeedant value F_(0.05,1,8) = 5.318 and Ft > F_(0.05,1,8)。

2.1 龙牙草乙醇、丙酮浸提液和水蒸汽蒸馏液对桃蚜的触杀作用 24 h 的毒力回归方程分析结果表明,乙醇浸提液和水蒸汽蒸馏液对桃蚜有较好的触杀作用,随着乙醇浸提液和水蒸汽蒸馏液质量浓度的增大校正死亡率升高,由各方程项对回归的贡献值和贡献率(按偏回归平方和降序排列)分别为 U₍₁₎ = 1 200、U₍₁₎/U = 95.6%; U₍₃₎ = 2.19、U₍₃₎/U = 0.175% 可知,乙醇浸提液对桃蚜的触杀作用大于水蒸汽蒸馏液。48 h 的毒力回归方程分析结果表明,水蒸汽蒸馏液对桃蚜的触杀不起作用,仅乙醇浸提液对桃蚜保持着较好的触杀作用,当乙醇浸提液质量浓度为 25.0 mg/ml 时,其 48 h 校正死亡率可达到 94.3%, LC₅₀ = 8.547 0 mg/ml。桃蚜虫体接触药液后,先是迅速无方向地四处爬动,然后爬动速度逐渐减慢直至静止不动,断定桃蚜虫体已瘫痪或麻痹,大部分虫体不能恢复正常状态,直接死亡,死亡状态为静止萎缩;24 h 内的观察和统计发现,少数桃蚜虽经历瘫痪或麻痹一段时间后还可以恢复,但表现出明显不取食量现象,直至死亡。由回归分析的结果可知,丙酮浸提液对桃蚜的触杀活性不显著。

2.2 龙牙草乙醇、丙酮浸提液和水蒸汽蒸馏液对桃蚜的拒食作用 24 h 的毒力回归方程分析结果表明,3 种药液对桃蚜均有较好的拒食作用,随着 3 种药液质量浓度的增大拒食率增高,各方程项对回归的贡献值和贡献率(按偏回归平方和降序排列)分别为 U₍₃₎ = 1 260、U₍₃₎/U = 81.1%; U₍₁₎ = 0.332、U₍₁₎/U = 0.021 4%; U₍₂₎ = 0.246、U₍₂₎/U = 0.015 9%, 水蒸汽蒸馏液 > 乙醇浸提液 > 丙酮浸提液对桃蚜的拒食活性。48 h 的毒力回归方程分析结果表明,乙醇浸提液和丙酮浸提液对桃蚜的拒食不起作用,仅水蒸汽蒸馏液对桃蚜保持显著的拒食作用,随质量浓度的增大拒食率升高,桃蚜在处理叶碟上的栖息数较在对照叶碟上少,在高质量浓度处理的叶碟又比低质量浓度处理的叶碟上显著减少,48 h 的水蒸汽蒸馏液拒食中浓度 AFC₅₀ 值为 10.212 1 mg/ml; 不同处理时间的拒食率不同,48 h 的拒食率均高于 24 h 的拒食率,说明 48 h 的拒食活性明显高于 24 h 的拒食活性。

3 讨论

(1) 触杀试验中,24 h 的毒力回归分析结果表明,乙醇浸提液和水蒸汽蒸馏液对桃蚜都有较好触杀作用,24 h 校正死

为: $Z_j = \sum_{i=0}^4 C_{ij} c_i$, $C_{ij} = [\text{Cov}(h_i, x_j) w_{ij}] / [\text{Var}(h_i) \text{Var}(x_j)]$, $c_i = [\text{Cov}(H_i, y) v_i] / [\text{Var}(H_i) \text{Var}(y)]$ 。用这 3 个公式计算得添加物、面积、颜色、糖醋酒 4 个输入量的 Z 值依次为 2.405 6、0.781 0、20.815 0、36.654 0。可见,糖醋酒引诱剂的添加情况与色板颜色为影响粘板诱捕蓟马数目最重要的因素,各种水溶胶粘板中添加引诱剂的蓝色粘板诱虫效果应为最佳。此外,由于小板易受风等因素影响导致数据不稳定,因此面积因素的 Z 值最小。

3 讨论

(1) 试验结果表明,水溶性黏着剂粘板既可以用于定量分析研究各种诱虫与驱虫物质对蓟马诱捕的影响,也可以在蓟马发生预测上发挥作用。另外虽然与油板相比诱虫效果略差,但也可以用于封闭的蔬菜保护地害虫防治^[11-14]。

(2) 试验的环境条件控制方面还有待于进一步细化,一些更精准的数学方法的建模分析也有必要进行深入的研究。

参考文献

[1] 任向辉,王运兵.水溶黏着剂色板的田间诱虫试验[J].安徽农业科学,

- 2008,36(14):6065-6067.
- [2] 刘乃森,刘福霞.神经网络及其在植物保护中的应用[J].安徽农业科学,2006,34(23):6237-6238.
- [3] 唐启义,冯明光.实用统计分析及计算机处理平台[M].北京:中国农业出版社,1997:451-515.
- [4] 蒋宗礼.神经网络导论[M].北京:高等教育出版社,2001:39-54.
- [5] 张海涛,刘超英,田水.权重确定的主客观综合法[J].江汉大学学报:自然科学版,2004,32(4):63-65.
- [6] 庞智强.主成分分析能客观赋权吗[J].统计教育,2006(4):9-12.
- [7] 戴文战.基于三层BP网络的多指标综合评估方法及应用[J].系统工程理论与实践,1999(5):29-34.
- [8] 郭伟斌,唐焕文,马占新.神经网络预测系统中的输入输出指标研究[J].大连理工大学学报,1999,39(4):583-587.
- [9] 高仁祥,张世英,刘豹.基于神经网络的变量选择方法[J].系统工程学报,1998(6):32-38.
- [10] 吴波,张寒俊.固相微萃取-气相色谱/质谱测定蔬菜中风味物质的研究[J].分析仪器,2006(2):25-31.
- [11] 梁萍,黄艳花.不同黏着剂黄板诱杀温室白粉虱效果试验[J].广西农业科学,2006,37(6):688-689.
- [12] 李洪安,王萱,李响,等.丽蚜小蜂和黄板诱杀防治温室白粉虱研究初报[J].中国农学通报,2007,23(7):475-477.
- [13] 王惠卿,吉艳玲,杨玮,等.利用佳多黄板诱杀葡萄斑叶蝉越冬代成虫试验[J].中国植保导刊,2007,27(8):28-29.
- [14] 屈军涛,安金海,刘向阳.黄板防治绣线菊蚜试验简报[J].西北园艺,2007(6):35-36.

(上接第 15293 页)

亡率高达 92.0%,说明龙牙草中具有触杀作用的生物活性物质既能被乙醇浸提出来,也能通过水蒸汽蒸馏获得,只是提取的量不同而已。或者是含有 2 种以上不同的对桃蚜具有触杀活性的物质。48 h 的毒力回归分析表明,仅乙醇浸提液对桃蚜有较好触杀作用,48 h 校正死亡率可达到 94.3%,触杀的 LC_{50} 值为 8.547 0 mg/ml,部分桃蚜虽未死亡,但取食量明显较对照少,且最终致死率均比处理 24 h 的高。分析原因大致有 4 种情况:一是龙牙草中起触杀作用的活性物质极易溶于乙醇且浸提量较多或者是在乙醇中保持较好的稳定性,也可能是水蒸汽蒸馏液中起触杀作用的活性物质的量少或者在水中不稳定、易分解等原因;二是龙牙草中含有 2 种以上具有触杀活性的物质,其各自的触杀作用机理不同,水蒸汽蒸馏液中的触杀活性物质作用时间短而乙醇浸提液中的触杀活性物质作用时间长;三是水蒸汽蒸馏液和丙酮浸提液中的触杀活性物质较乙醇浸提液中的触杀活性物质易被桃蚜产生抗药免疫力等原因所致;四是可能 24 h 的触杀作用 2 种药液同时作用的结果,2 种药液同时起作用使触杀率达到一定的数值,随着时间的延长乙醇浸提液中的触杀活性物质继续起作用所致。丙酮浸提液对桃蚜的触杀作用表现不明显,可能是具有触杀活性的物质不溶于丙酮或少量溶解导致现象不显著。

(2) 拒食试验中,可能 24 h 的拒食作用是 3 种药液同时作用的结果,说明龙牙草中具有拒食作用的生物活性物质均能被乙醇和丙酮浸提出来,也能通过水蒸汽蒸馏出来,只是提取的量不同而已,或者是含有 3 种以上不同的对桃蚜具有拒食活性的物质。从 48 h 的拒食活性分析结果表明,仅水蒸汽蒸馏液表现显著,48 h 的水蒸汽蒸馏液拒食中浓度 AFC_{50} 值为 10.212 1 mg/ml,且 48 h 的拒食率都高于 24 h,这可能是龙牙草中起拒食作用的活性物质主要靠水蒸汽蒸馏的方

法提取,或者是水蒸汽蒸馏液中起拒食作用的活性物质较强;也可能是乙醇浸提液和丙酮浸提液中起拒食作用的活性物质不强,或者是 3 种药液中具有拒食活性的不同物质的拒食作用机理不同;乙醇浸提液和丙酮浸提液中的拒食活性物质作用时间短,而水蒸汽蒸馏液中的拒食活性物质作用时间长;还有可能是乙醇和丙酮浸提液中的拒食活性物质较水蒸汽蒸馏液中的拒食活性物质易被桃蚜产生抗药免疫力等原因。同时,试验应用均匀设计法进行试验设计和分析处理数据缩短了研究的周期,减少了试验次数,提高了准确性。目前,国内外对龙牙草杀虫生物活性的研究未见报道。试验结果对利用龙牙草进一步研究和开发新型的植物源农药有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 乔淑芬.兴安獐牙菜不同提取液对甘蓝夜蛾的生物活性研究[J].长江蔬菜,2009(6):60-62.
- [2] 顾地周,车喜全,王立斌,等.半夏提取液对大豆蚜虫生物活性及活性剂量的初步筛选[J].农药,2008,47(12):927-929.
- [3] 顾地周,车喜全,赵玉敏.白藜不同提取液对菜缢管蚜的生物活性研究[J].长江蔬菜,2008(10):69-71.
- [4] 刘利,刘春雷,顾地周,等.节蓼不同提取液对白背飞虱的生物活性研究[J].安徽农业科学,2008,36(31):13756-13757.
- [5] 顾地周,车喜全,朱俊义,等.独角莲不同提取液对大豆蚜虫的生物活性及活性浓度的初步筛选[J].大豆科学,2008,27(6):1010-1014.
- [6] 方开泰.均匀设计——数论方法在试验设计的应用[J].应用数学学报,1980,3(4):363-372.
- [7] LI Y M,JIANG Y T,SUN Z H. Uniform design for optimizing regeneration shoots directly from young leaves and plant regeneration system of rhododendron chrysanthum pall[J]. Agricultural Science & Technology,2008,9(6):31-34.
- [8] 姚通稳,赵海晋,李易进.利用均匀设计法确定最佳配料方案[J].建材技术与应用,2001(1):17-18.
- [9] YANG H,TIAN R,CHEN H L. A Preliminary study on biological activity of wiktstroemia chamaedaphne meissn[J]. Agricultural Science & Technology,2009,10(1):149-152.